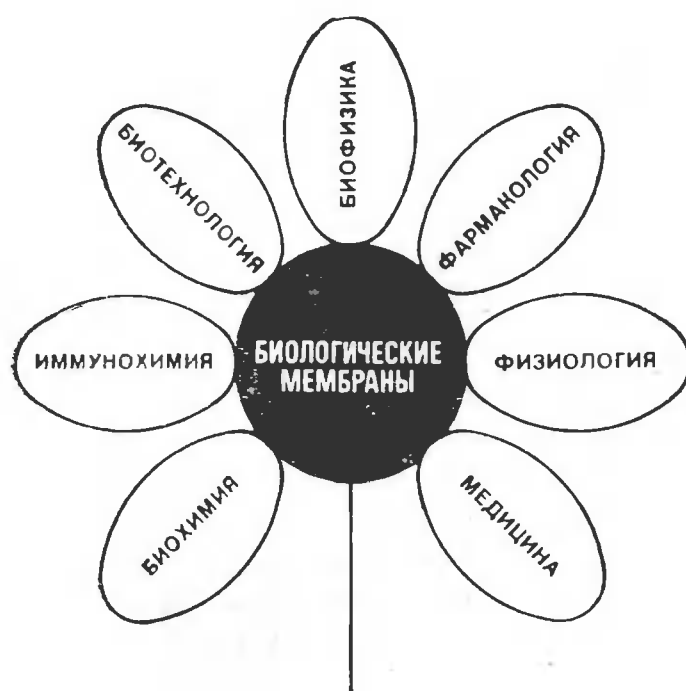


БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Р. Н. ГЛЕБОВ

Эндоцитоз и экзоцитоз





БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Под редакцией
А.А. Болдырева

Книга 2

Р. Н. ГЛЕБОВ

ЭНДОЦИТОЗ И ЭКЗОЦИТОЗ

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебного пособия для студентов биологических и медицинских специальностей высших учебных заведений



МОСКВА
«ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1987

Рецензенты:

кафедра биохимии медико-биологического факультета 2-го Московского государственного медицинского института имени Н. И. Пирогова (зав. кафедрой проф. А. И. Арчаков);
д-р хим. наук, проф. В. И. Швец (Московский институт тонкой химической технологии имени М. В. Ломоносова)

Биохимия мембран: Учеб. пособие для биолог.
Б63 и мед. спец. вузов/Под ред. А. А. Болдырева. Кн. 2.
Р. Н. Глебов. Эндоцитоз и экзоцитоз.— М.: Высш.
шк., 1987.— 95 с.: ил.

Книга посвящена актуальной проблеме мембранологии — изложению современных представлений о молекулярных механизмах эндоцитоза (захвата макромолекул и частиц внутрь клеток) и экзоцитоза (выброса веществ из клеток); описаны механизмы сопряжения возбуждения и секреции, слияния и слияния мембран, рециклизации мембран и их компонентов и т. д. В пособии учтены последние достижения биологии и медицины.

Б 2007020000(4309000000)—363 18—87
001(01)—87

ББК 28.05
57.04

Предисловие

Книга продолжает серию учебных пособий по современным проблемам биохимии мембран и дает основные сведения об эндоцитозе и экзоцитозе веществ клетками. Здесь рассмотрены проблемы, которые ранее изучались в разделе физиологии и цитологии клетки. Лишь за последнее время эндоцитоз и экзоцитоз закономерно стали считаться одной из проблем мембранологии.

Предлагаемая книга, как и выпускаемые пособия из серии «Биохимия мембран», предназначена для фундаментальной подготовки студентов в области мембранологии. Ее изучение необходимо и для более глубокого проникновения в область биохимии и молекулярной биологии клетки, и для овладения методами биотехнологии и медицинской биохимии. Производство биологически активных веществ биологическим способом, их использование для стимуляции или модификации метаболизма, понимание молекулярных основ патологических изменений в тканях и выработка рекомендаций для профилактики и лечения, выяснение закономерностей осуществления и регуляции клеточного цикла — все эти теоретические или практические задачи требуют подготовки специалистов в области мембранологии.

Эндоцитоз и экзоцитоз исключительно важны для функционирования практически любых клеток; оба процесса вовлечены в разнообразные проявления метаболизма, физиологического ответа клеток на внешние воздействия. Они связаны с работой клеточных и внутриклеточных мембранных структур. Поиск универсализации заставил автора выявлять то общее, что объединяет оба процесса — эндо- и экзоцитоз.

Изложение многих вопросов, связанных с захватом и секрецией тех или иных веществ клетками, имеет не только общебиологический интерес. Существующие научные знания об эндо- и экзоцитозе играют немаловажную роль в решении задач народного хозяйства и практической медицины.

При изложении материала автор испытывал определенные трудности, поскольку подобный систематический анализ вышеуказанных проблем ранее практически никем не проводился. Автор надеется, что книга послужит стимулом для дальнейшего углубленного изучения проблем мембранологии.

Автор

Введение

Цель настоящего учебного пособия — изложить современные представления о механизмах и регуляции процесса поглощения различных веществ клетками — *эндоцитоз* — и процесса выделения тех или иных веществ клетками — *экзоцитоз*.

Первый путь эндоцитоза — *фагоцитоз* был открыт И. И. Мечниковым в 1883 г., второй путь — *пиноцитоз* — В. Льюисом (США) в 1931 г., третий путь — *рецептор-индуцируемый эндоцитоз* — К. Портером и Т. Ротом (США) в 1964 г. В 60—70-е годы были сформулированы основные представления о механизмах экзоцитоза.

В 70—80-е годы стало ясно сходство явлений эндо- и экзоцитоза на мембранном уровне, поскольку оба феномена связаны с изменением не только структуры, но и формы и размеров плазмалеммы.

Процессы эндо- и экзоцитоза объединяет общность механизмов *межмембранного взаимодействия*, слипания и слияния мембран. Рассмотрение на мембранном уровне процессов эндо- и экзоцитоза закономерно приводит ко многим глобальным закономерностям функциональной биохимии мембран: *контейнерный транспорт* разнообразных веществ внутри клетки от центра к периферии и обратно; обновление (*рециклизация*) мембран и их компонентов (например, рецепторов); межклеточный обмен информационными макромолекулами; особенности синтеза секретруемых белков и пути их встраивания в мембрану; функционирование сократительных белков цитоскелета и многие другие проблемы. Изучение механизмов и регуляции эндо- и экзоцитоза является перспективным направлением в мембранологии, уже сейчас имеющим практическую значимость для медицины.

Монографии и обзорные работы, рассматривающие эндо- и экзоцитоз с единых позиций, практически отсутствуют в отечественной научной литературе. Вследствие важности этого раздела мембранологии мы считаем целесообразным посвятить этому вопросу настоящий выпуск продолжающейся серии «Биохимия мембран».

Неспецифический эндоцитоз (пиноцитоз и фагоцитоз)

1

1.1. Общая характеристика

Цитоз — уникальный способ поглощения клеткой крупных веществ и частиц и их выделения с помощью изменения структуры, формы и размеров *плазмалеммы* (клеточной мембраны). Этот способ отличен от диффузии, пассивного и активного транспорта индивидуальных низкомолекулярных веществ через мембраны. Во внеклеточной среде (в большинстве случаев в низкой концентрации) содержится масса веществ; среди них строительный материал для клеток, питательные вещества, физиологически активные соединения, «отходы» метаболизма, а также токсины, бактерии, вирусы и пр. Каждая клетка при помощи плазмалеммы захватывает из среды «нужные» ей компоненты. Такой захват осуществляется при помощи эндоцитоза.

Эндоцитоз — универсальное явление, характерное для любых клеток. Наиболее выражено эндоцитоз проявляется в клетках простейших, в клетках печени, мозга (чаще всего глии), эпителия, форменных элементов крови, макрофагов, в клетках злокачественных опухолей, в эмбриональных клетках и в меньшей степени — миоцитов. При эндоцитозе определенный участок плазмалеммы захватывает, обволакивает внеклеточный материал, который таким образом попадает внутрь клетки. Сначала этот материал заключается в везикулу — сфероидную органеллу, образованную из фрагментов плазмалеммы; внутри клетки содержимое везикулы постепенно трансформируется. Благодаря постоянно осуществляющемуся эндоцитозу происходит обновление клеточной мембраны.

Эндоцитоз — это борьба с инфекцией; это поддержание клеточного гомеостаза путем захвата питательных веществ; это ограничение времени действия сигнальной информации (гормонов, медиаторов, иммунных стимулов).

Существует три варианта эндоцитоза (термин предложен в 1963 г.): *фагоцитоз*, *пиноцитоз* и *специфический эндоцитоз* (рис.

1, табл. 1). Первые два явления (исходя из свойств захватываемого материала) могут быть названы *неспецифическим эндоцитозом*. Неспецифичность фагоцитоза и пиноцитоза наглядно проявляется в поглощении клеткой не нужных ей веществ (например, частичек сажи) или вредных веществ (красителей). Механизмы фагоцитоза и пиноцитоза во многом сходны и различаются по объему и массе захватываемого материала. Видимо, любой участок плазмалеммы участвует в неспецифическом эндоцитозе. Предполагают, что при эндоцитозе *контактный участок* мембраны отличается от других участков обилием элементов цитоскелета на внутренней поверхности плазмалеммы и наличием микроворсинок, ресничек в зоне внешней поверхности мембраны.

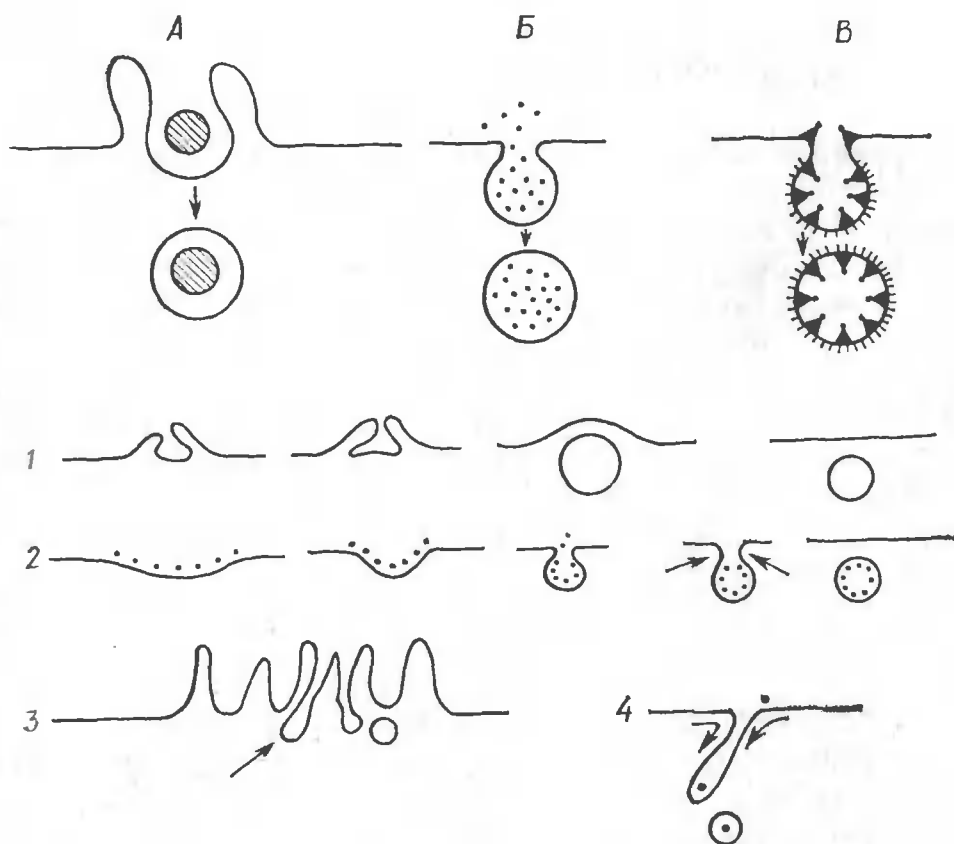


Рис. 1. Три типа эндоцитоза. А — фагоцитоз; Б — пиноцитоз; В — специфический эндоцитоз:

1 — последовательные фазы фагоцитоза (образование псевдоподий или «ловчих парусов»); 2—4 — последовательные фазы пиноцитоза (2 — инвагинация плазмалеммы, 3 — эндоцитоз реснитчатой поверхности, 4 — пиноцитоз с образованием удлиненного узкого канала с захваченным материалом); стрелками указана промежуточная стадия образования пиноцитозных каналов; черными точками — адсорбционный пиноцитоз

Проникновение в клетку частиц, биополимеров, макромолекул включает три основных этапа: эндоцитоз; трансформацию захваченного материала (разложение субстратов до низкомолекулярных фрагментов); удаление неперевариваемых остатков за пределы клетки (секреция). Сам процесс эндоцитоза имеет

Таблица 1. Характеристики эндоцитоза

Характеристические параметры	Исследуемые процессы		
	фагоцитоз	пиноцитоз	специфический эндоцитоз
Природа захватываемого материала	Инеродные частицы, бактерии, клетки, липосомы, вирусы, молекулярные комплексы	Малая капля жидкости, белки, гликопротеины, макромолекулы	Мелкая капля жидкости, гормоны, белки, лектины, токсины, вирусы, гликопротеины
Название эндосомы	Фагосома	Пиносома	Одетая везикула
Диаметр эндосом, мкм	1—>10	≤0,1 (иногда до 1,0)	0,1—0,2
Характер поглощения	Адс (кривая с насыщением)	Адс (кривая с насыщением); жф (линейная зависимость)	Адс (кривая с насыщением)
Длительность процесса	Дискретно	Жф (постоянно)	Дискретно
Трансформация захваченного материала	В лизосомах	В лизосомах	В системе ГЭРЛ
Энергия активации, кДж/моль	227	Жф: 76	—
Зависимость от биоэнергетики, чувствительность к блокаторам дыхания, гликолиза	++	Адс (+); жф (зависит слабо)	++
Температура, °С	17—20	Жф (2—>38)	—
Действие цитохалазина В	Торможение	Адс (торможение); жф (не влияет)	Торможение

Продолжение табл. 1

Характеристические параметры	Исследуемые процессы			специфический эндоцитоз
	фагоцитоз	пиноцитоз		
Какая часть плазмалеммы участвует в процессе?	Любая; чаще всего там, где больше элементов цитоскелета на внутренней поверхности плазмалеммы	Любая; иногда на внешней поверхности плазмалеммы обилие микроворсинок, ресничек		Специализированный участок: на внешней поверхности плазмалеммы — рецепторы, на внутренней — окаймленные ямки с кластрином, там же скопление цитоскелета
Какая поверхность плазмалеммы составляет внешнюю поверхность эндосом?	Внутренняя	Внутренняя		Внутренняя
Слияние эндосом ингибируется Кон А	Нет	Жф (Да)		—
Слияние эндосом ингибируется макроанионами	Да	Жф (Нет)		—

Примечание. Адс — адсорбционный; жф — жидкофазный, Кон А — конканавалин А; Адс-фагоцитоз и пиноцитоз крупных частиц и капель жидкости нередко обозначают макроэндоцитозом, в отличие от жф-пиноцитоза, т. е. микроэндоцитоза; (+ и ++) означают интенсивность ответа.

четыре фазы: 1) адсорбция захватываемого материала плазмалеммой; 2) волнообразные движения (ундуляция) мембраны, инвагинация участка плазмалеммы в зоне контакта; 3) *везикуляризация*, т. е. слипание и слияние контактирующих мембран вследствие прямой (углубление) или обратной (впячивание) инвагинации с образованием эндоцитозного пузырька — *эндосомы* (фагосомы или пиносомы); 4) отрыв везикулы от мембраны. Последние три фазы называют *интернализацией*.

Образованию эндосом предшествует формирование так называемых *удлиненных эндоцитозных каналов*. Сорбция поглощаемых молекул и частиц на поверхности клеточной мембраны определяется не столько самой поверхностной мембраной, сколько *гликокаликсом* — мукополисахаридным волокнистым слоем, примыкающим непосредственно к наружной поверхности мембраны. Гликокаликс представляет собой примембранный рыхлый слой густо разветвленных олигосахаридных цепей гликолипидов и гликопротеинов, входящих в состав плазмалеммы. При физиологическом значении рН среды этот слой содержит отрицательно заряженные группы. Толщина гликокаликса для клеток животных колеблется в диапазоне 3—6, нередко до 10 нм. Кислые мукополисахариды также входят в состав гликокаликса. Углеводные компоненты мембран составляют почти 10% от их сухой массы. Гликокаликс сильно гидратирован, имеет желеподобную структуру, в нем локализованы ферменты, секретированные клеткой; они связаны с зоной гликокаликса с помощью Ca^{2+} или Mg^{2+} . Эти ферменты участвуют в обмене компонентов гликокаликса. Продукты этого обмена непосредственно усваиваются клеткой. Таким образом, эти ферменты «на месте» осуществляют регенерацию клеточной поверхности.

Гликокаликс обнаружен практически у всех клеток животных; он довольно variabelен по своей химической структуре и размерам. Этот слой важен для рецепции, эндоцитоза, фильтрации, внеклеточного пищеварения, создания околоклеточной среды. В гликокаликсе скорость диффузии различных веществ снижается.

Гликокаликс хорошо выявляется рутениевым красным и Кон А. В опухолевых клетках структура гликокаликса резко нарушена, изменяется знак заряда на внешней поверхности плазмалеммы.

Гликокаликс считают маркером внешней поверхности плазмалеммы, в то время как маркером ее внутренней поверхности является *эктоплазма* (рис. 2). Эктоплазма в отличие от эндоплазмы обладает более вязкой структурой, обеднена органеллами, насыщена цитоскелетом, который регулирует эластичность мембраны, кластеризацию белков в ней, волнообразные движения плазмалеммы и другие свойства примембранной области, которые важно учитывать при рассмотрении эндо- и экзоцитоза.

Процесс сорбции прослеживается при помощи специальных маркеров эндоцитоза — окрашенных или флуоресцирующих сое-

динений. Чаще всего — это конъюгаты декстрана, различных белков (ферритина, пероксидазы хрена и др.) с флуоресцирующими красителями.

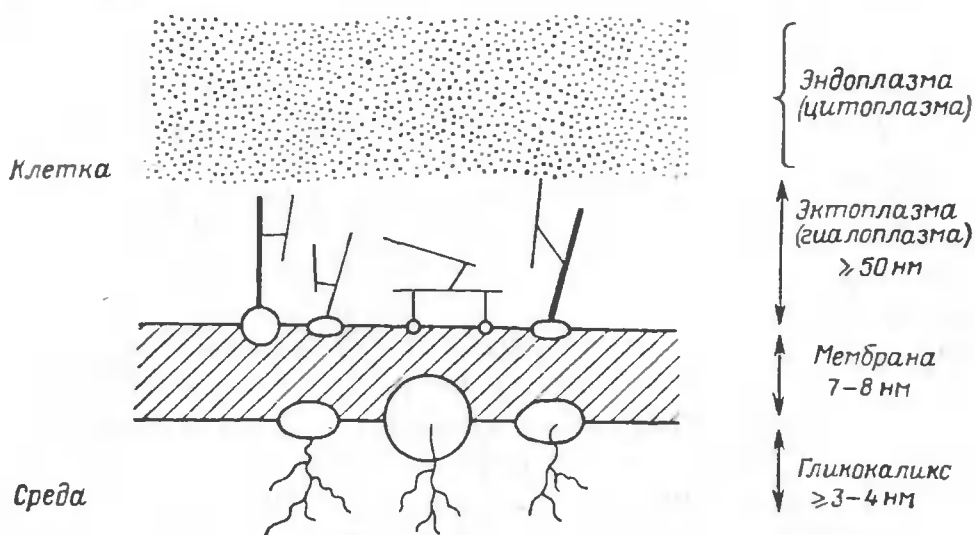


Рис. 2. Периферические зоны клеточной мембраны

Эндоцитоз активируется в присутствии поврежденных, отмерших клеток или в случае повреждения органа. Например, частичная гепатэктомия вызывает резкое усиление эндоцитоза у гепатоцитов (эти клетки в норме не отличаются активным эндоцитозом). Таким образом, эндоцитоз направлен не только против патогенных микроорганизмов, но и против собственных нежизнеспособных клеток.

Эндоцитоз — один из способов питания клетки. Например, клетка эпителия тонкого кишечника млекопитающих образует до 1000 пиносом за 1 с. Пероксидаза хрена через 5 мин после добавления к макрофагам уже обнаруживается в их пиносомах, а через 1 ч полностью подвергается гидролизу в лизосомах. Макрофаги образуют 125 пиносом за 1 мин. Скорость пиноцитоза для макрофагов — 30—50, для амебы — 1600—2400 нл/10⁶ клеток за 1 ч. «Эндоцитозное питание» особенно характерно для одноклеточных. Амеба может с помощью пиноцитоза поглощать белки в количестве до 20—25% от своей собственной массы (за 1 ч), объем клетки за этот период увеличивается в 50 раз.

Пиноцитоз может быть жидкофазным и адсорбционным. В первом случае поглощаются растворимые макро- и микромолекулы, жидкая среда; во втором — макромолекулы и малые частицы (кислые белки, ферритин, липопротейны, лектины, антитела, вирионы, коллоидные частицы, иммунные комплексы). В первом случае процесс не зависит от температуры и линейно зависит от концентрации поглощаемых соединений; во втором — он чувствителен к температуре, захват веществ происходит с насыщением. В первом случае растворимые вещества не адсорбируются плазмалеммой, во втором — процесс более специфичен:

сначала происходит адсорбция вещества, затем непосредственно пиноцитоз.

Хорошими маркерами жидкофазного пиноцитоза являются ^{198}Au , ^{125}I -пероксидаза, ^{125}I -сывороточный альбумин, поливинилпирролидон. Длительность пиноцитоза зависит от типа клеток и характера субстрата. Многие клетки (макрофаги, фибробласты, клетки эпителия, почек, семявыносящих протоков и др.) в случае жидкофазного пиноцитоза образуют пиносомы постоянно, в течение длительного времени, хотя и с различной скоростью. Клетки, обладающие высокой скоростью обновления макромолекул, характеризуются высокой степенью *фагоцитоза*. Например, клетки эпителия почечных канальцев, молочных желез после лактации, остеокласты. Нейтрофилы или макрофаги в процессе фагоцитоза не снижают способности транспортировать нуклеотиды и аминокислоты, даже при условии, когда 30—50 % клеточной поверхности интернированы внутрь клетки.

1.2. Индукторы эндоцитоза

Первичным актом эндоцитоза является *сорбция молекул внешней поверхностью плазмалеммы*. На примере изучения пиноцитоза у амёб было замечено, что внесение в среду инкубации белков индуцирует эндоцитоз. Эти исследования показали, что индукторами эндоцитоза являются растворимые (главным образом основные) белки. Эти белки содержат положительно заряженные группы, связывающиеся с отрицательно заряженными группами гликокаликса или самой поверхностью мембраны (электрически нейтральные вещества — углеводы, нуклеиновые кислоты не стимулируют пиноцитоз). Эндоцитозу способствуют не только электростатическое, но также и гидрофобные взаимодействия, возникающие между неполярными участками мукополисахаридного слоя гликокаликса и захватываемого материала.

Все эти данные, полученные на амёбах, указывали, что эндоцитоз — процесс неспецифический, поскольку его могут вызывать самые разнообразные вещества независимо от размера их молекул. Предварительное голодание амёб значительно облегчало индукцию пиноцитоза при помощи сывороточных белков, АТФ, глюкозы и Кон А. На тканевых клетках получены аналогичные результаты. Во всех случаях *типичные индукторы эндоцитоза* одни и те же — это основные белки и ферменты (сывороточный альбумин, γ -глобулин, протамин, пероксидаза, РНКаза, ферритин, цитохром *c*).

Индукторами эндоцитоза в тканевых клетках могут быть витамины, антибиотики, различные физиологически активные вещества. В макрофагах пиноцитоз индуцируется макроанионами: альбумином, L-полиглутаматом, мукополисахаридами, нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами. Окисление экзогенных или эндогенных жирных кислот — свободных или в составе фосфолипидов — способствует фагоцитозу.

Слабополярные или неполярные гидрофобные вещества в тканевых клетках являются малоэффективными индукторами. Сорбция такого рода веществ гликокаликсом и (или) плазмалеммой будет определяться наличием в них положительно заряженных гидрофильных групп (например, кислые фосфолипиды). Нейтральные (сахара) или кислые (нуклеиновые кислоты, красители) соединения на тканевых клетках, как правило, не индуцируют эндоцитоз, однако эти вещества могут пассивно захватываться клетками в присутствии различных кофакторов.

Вопрос о захвате клеткой смеси различных веществ пока остается неясным. Так, эндоцитоз нейтральных белков тормозится в присутствии кислых полипептидов, тогда как основные полипептиды усиливают эндоцитоз. Некоторые микромолекулы могут поглощаться клетками за счет их комплексирования с хорошо поглощаемыми макромолекулами. Пиноцитоз альбумина ускоряется в присутствии поликатионов и ослабляется в присутствии полианионов.

Замечено, что белок тем легче подвергается эндоцитозу, чем легче он связывается с мембранами. Кроме того, белки, обладающие высокой скоростью обновления, эндоцитируются клетками интенсивнее, чем медленно обновляющиеся белки. Эндоцитоз веществ, связывающихся на поверхности клеток, протекает в 3—4 раза быстрее, чем эндоцитоз веществ в растворе. В первом случае скорость эндоцитоза определяется типом молекулы, ее структурой, структурой гликокаликса, степенью связывания вещества с мембраной; во втором случае эндоцитоз лишен избирательности, а вещества из раствора поглощаются с одинаковой скоростью.

В отличие от адсорбционного пиноцитоза жидкофазный пиноцитоз в большинстве клеток протекает непрерывно в течение 2 ч — 4 сут даже в отсутствие белков в среде. В момент инициации митоза пиноцитоз прекращается. Жидкофазный пиноцитоз в макрофагах индуцируется Кон А, форболмиристатацетатом, в эпителии мочевого пузыря — антидиуретическим гормоном, в фибробластах и миоцитах гладких мышц — фактором роста тромбоцитов, эпидермальным фактором роста. Факторы, снижающие адсорбционный захват веществ, также способны подавлять и жидкофазный пиноцитоз.

Фагоцитоз в отличие от пиноцитоза представляется более сложным процессом. Основные этапы фагоцитоза таковы: поверхность определенных частиц узнается фагоцитом, при этом фагоцит получает сигнал для узнавания; клетка каким-то образом передает в цитоплазму сигнал о захвате частиц; затем происходит сорбция частицы плазмалеммой; формирование псевдоподий и обволакивание ими этой частицы; наконец, осуществляется слияние вершук псевдоподий, в основе которого лежит межмембранное взаимодействие.

Фагоцитозу нередко предшествует взаимодействие частиц с опсонинами. Опсонины — белки сыворотки крови: иммуногло-

булины (IgG), комплемент (C3b), фибронектин. Опсонины абсорбируются на частице (бактерии), которая при этом лучше связывается с плазмалеммой. Опсонины связываются либо с частицей и рецепторами плазмалеммы, либо только с частицами. Опсонизация частиц не всегда делает их окончательно готовыми для фагоцитоза. Например, перитонеальные макрофаги не фагоцитируют комплемент (фагоцитоз индуцируется лишь в присутствии *лимфокинов* — белков, секретируемых Т-лимфоцитами), но поглощают комплекс лимфоцитов с антителами к мембранному IgG. Лимфокины, связываясь с рецепторами мембран макрофагов, дополнительно облегчают фагоцитоз опсонированных частиц. Фагоцит тем лучше поглощает частицы, чем они гидрофобнее, и хуже поглощает частицы, поверхность которых гидрофильнее, чем поверхность фагоцита.

Лимфокины снижают гидрофобность макрофагов и облегчают фагоцитоз опсонированных эритроцитов. Опсонизация макрофагов видонеспецифичными альбуминами делает эти клетки неспособными различать при пиноцитозе аутологичный и чужеродный материал.

В выделенных фаголизосомах макрофагов, которые захватывали эритроциты, опсонированные IgG или комплементом, состав мембран специфичен и резко отличается от состава плазмалеммы (по данным йодирования белков). По другим данным, белковый спектр внешней поверхности мембран фаголизосом и внешней поверхности плазмалеммы не идентичен. Состав мембран фаголизосом зависит от природы фагоцитирующего материала. Макрофаги, захватывающие IgG-опсонированные липосомы, теряют на своей клеточной поверхности Fc-, но не C3b-рецепторы. Макрофаги фагоцитируют белковые антигены, процесс усиливается в присутствии Кон А, но при этом образовавшиеся фагосомы не сливаются с лизосомами. Однако при добавлении маннозы, которая конкурирует за связывание с некоторыми рецепторами Кон А, наблюдается быстрое слияние фагосом с лизосомами. Эти опыты моделируют события, которые происходят при некоторых инфекционных заболеваниях.

Если макрофаги инкубировать с частицами, связывающимися с мембраной, но не захватывающимися клеткой, в этом же районе связывается вторая частица, которая приобретает способность захватываться клеткой. Отсюда следует, что фагоцитоз включает в себя *локальные изменения плазмалеммы*, передающей сигнал для инициации фагоцитоза.

Таким образом, фагоцитоз в целом — активный процесс. *Активный фагоцитоз* — это чаще всего индуцируемый рецепторами захват клеток, бактерий, макромолекул, который зависит от метаболизма, от температуры. *Пассивный фагоцитоз* — это, как правило, захват нейтральных частиц, он проходит без участия рецепторов и не зависит от метаболизма и температуры.

Ионы Ca^{2+} во внеклеточной среде также необходимы для инициации фагоцитоза, например, как это показано для сорбции

макрофагами эритроцитов, опсонированных при помощи IgG. Замена Ca^{2+} на Mg^{2+} устраняет фагоцитоз. Ионы Са увеличивают скорость поглощения сывороточного альбумина лейкоцитами. Максимальная активность фагоцитоза проявляется тогда, когда процесс идет с определенной частотой, после каждого акта наступает рефрактерный период.

1.3. Трансформация эндоцитозного материала

В процессе трансформации захваченного материала особую роль играет система: аппарат Гольджи — эндоплазматический ретикулум (ЭПР) — лизосомы, именуемая *системой ГЭРЛ*. Аппарат Гольджи и частично цистерны ЭПР в ходе везикуляризации составляют клетке набор везикул с различными свойствами (рис. 3).

Для большинства клеток механизм утилизации эндоцитозно-

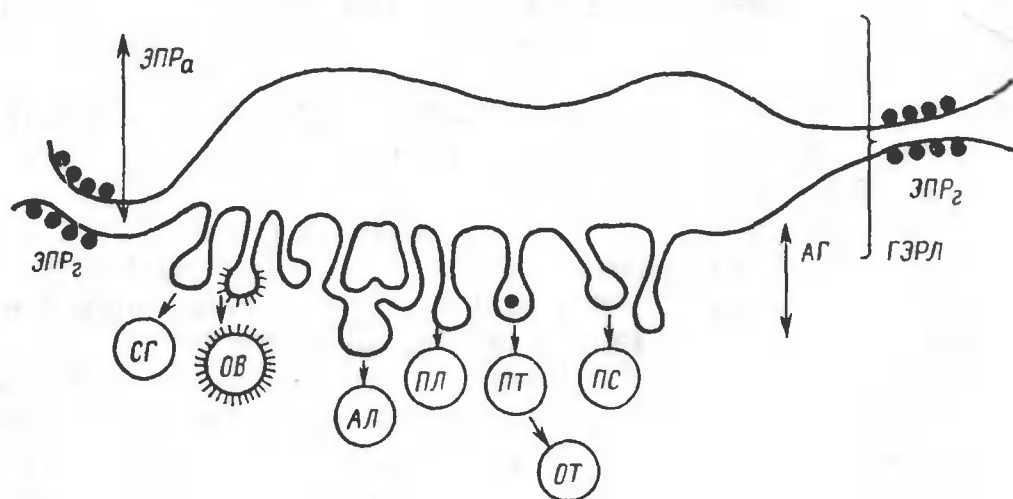


Рис. 3. Система ГЭРЛ и формирование разнообразных везикул и вакуолей:

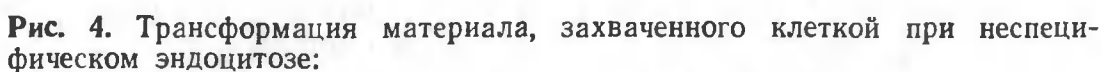
АГ — аппарат Гольджи (пластинчатый комплекс), АЛ — аутолизосома (аутофагосома, цитосегресома), ОВ — одетая везикула, ОТ — остаточное тельце (телолизосома), ПЛ — первичная лизосома, ПС — пероксисома, ПТ — плотное тельце, СГ — секреторная гранула, ЭПР_а — агранулярный (гладкий) эндоплазматический ретикулум, ЭПР_г — гранулярный (шероховатый) ЭПР

го материала в принципе универсален (рис. 4), хотя и может отличаться в деталях.

Транспорт эндосом от плазмалеммы к центру клетки, где происходит их трансформация, протекает быстро, в течение короткого времени. Образовавшиеся эндосомы как в случае фагоцитоза, так и пиноцитоза, сливаясь друг с другом или с некоторыми лизосомами, преобразуются в *эндоцитозные вакуоли*. В эндосомах и вакуолях начинается первичное разложение захваченного материала.

Гистохимически во многих клетках обнаружено, что в эндосомах и вакуолях локализованы кислая и щелочная фосфатазы, АТФаза, β -глицерофосфатаза. По-видимому, эндосомы и вакуо-

Биохимический состав эндосом и вакуолей зависит в одной и той же клетке от природы захватываемого материала. Например, фагоцитозные вакуоли амёб, содержащие неусвояемые час-



ЭП, ЭВ, ПЛ, ОТ сливаются с плазмалеммой и экзоцитируют свое содержимое. Не в каждой клетке полностью протекают все изображенные процессы. ПЛ, ВЛ и другие органеллы связаны друг с другом через механизм слияния. В нейронах рядом с плазмалеммой нередко выявляются мелкие везикулы — кавеолы ($d < 60$ нм), расположенные гексагонально на расстоянии 110—130 нм. Кавеолы участвуют в рециклизации мембран.

Эндоцитозные вакуоли способны к агрегации либо, наоборот, разделяются на несколько мелких везикул за счет осмотического давления. Осмотическое давление содержимого клеток выше, чем содержимого вакуоли. При диссоциации крупных эндосом, и вакуолей на более мелкие в каждой из них остаются опреде-

17

ленные типы субстратов, т. е. происходит дифференциация мелких эндосом по типу перевариваемых веществ. При фагоцитозе каждая мелкая эндосома содержит только один компонент захваченной смеси веществ.

В большинстве случаев вакуоли сливаются с первичными лизосомами, в которых содержится набор различных гидролаз, обеспечивающих распад большинства поглощенных клеткой экзогенных и эндогенных веществ. При слиянии образуются вторичные лизосомы, где и продолжается гидролиз. Это процесс называется *гетерофагией*. Утилизация в тех же лизосомах внутриклеточных компонентов называется *аутофагией*. Последний процесс протекает при участии мультивезикулярных телец, возникающих в результате сегрегации отдельных поврежденных органелл или участков цитоплазмы, в образование которых вовлекаются различные клетки. Отходы, неперевариваемые вещества, пигменты клетка секретирует в виде остаточных телец, которые выбрасываются целиком из клетки при контакте везикул, их содержащих, с плазмалеммой.

Из эндосом захваченные микромолекулы (ионы, моносахариды, аминокислоты и др.) легко могут проникать в цитоплазму клетки и включаться в обмен. При отсутствии в среде инкубации аминокислот синтез белка в макрофагах снижается на 30%, но в присутствии в среде 2% альбумина процесс нормализуется за счет пиноцитоза этого белка и его дальнейшей трансформации.

При некоторых патологических процессах обнаружено, что лизосомы, сливаясь с плазмалеммой, секретируют свои ферменты за пределы клетки (см. разд. 3.4). Стабилизация лизосомных мембран стероидными гормонами приводит к полному нарушению взаимодействия и слияния фагосом и их вакуолей с лизосомами. Обработка кортизоном резко снижает адсорбцию индуктора пиноцитоза плазмалеммой. У полиморфноядерных лейкоцитов в условиях разборки микротрубочек (обработка цитостатиком) подавляется образование фаголизосом. На этих лейкоцитах показано, что цАМФ и адреналин ингибируют фагоцитоз, разрушают микротрубочки, стабилизируют мембраны лизосом; цГМФ, наоборот, стимулирует фагоцитоз и вызывает сборку микротрубочек.

При терапии специфических «лизосомных» болезней эндоцитоз оказывает положительную роль, способствуя избирательному накоплению в лизосомах ряда экзогенных ферментов и лекарственных препаратов. Такую же функцию эндоцитоз выполняет при использовании в лечении ряда заболеваний липосом, содержащих ферменты или лекарства, хотя липосомы могут слипаться с клеткой-мишенью и секретировать свое содержимое в цитоплазму клетки. На последних стадиях эндоцитоза могут возникать вещества с высокой биологической активностью, которые регулируют синтез антител и активируют иммунитет.

Судьба эндоцитируемой ДНК в клетке не совсем ясна. Счи-

тают, что бóльшая ее часть разрушается в лизосомах, а некоторая, малая, может вызывать трансформацию в клетке, включаясь в ее геном.

Из рис. 4 следует, что при эндоцитозе эндосомы вовлекаются в лизосомную трансформацию, в то время как при феномене усиленного пиноцитоза после экзоцитоза (см. разд. 2.6) мелкие и крупные эндосомы способны помимо лизосом также слипаться с цистернами аппарата Гольджи. В некоторых клетках (например, в эпителии) описан трансклеточный транспорт веществ, при этом крупные эндосомы переносят вещества от одной части клетки к другой (противоположной), минуя систему ГЭРЛ (см. разд. 1.6).

Таким образом, при эндоцитозе наблюдаются разнообразные процессы слияния мембран в системе эндосома — эндосома, эндосома — лизосома, эндосома — аппарат Гольджи, эндосома (а также лизосома) — плазмалемма. При нейтрализации полиморфноядерными лейкоцитами бактерий молекулярное содержимое последних переваривается в течение нескольких часов. Лизосомы этих лейкоцитов гетерогенны по составу и форме, клетки содержат также специфические гранулы, в которых локализованы щелочная фосфатаза, лизоцим, лактоферрин. При этом фагосомы и вакуоли сливаются сначала со специфическими гранулами и только затем с лизосомами. Все это происходит в течение нескольких минут, в этот период в клетках отмечено значительное усиление окислительных процессов.

Показано, что в макрофагах кинетика слияния фагосом с лизосомами не зависит от числа этих органелл в клетке и не изменяется при обработке клеток колхицином или цитохалазином В. Введение в состав мембран экзогенных жирных кислот (19:0 и 18:1) значительно снижает скорость эндоцитоза в макрофагах, но мало влияет на процесс слияния мембран. Слияние мембран эндосом и лизосом усиливает форболмиристатацетат, а также активация макрофагов иммунолигандами, тормозят — полианионы, снижение температуры, обработка веществами, устраняющими ΔpH в кислых компартментах, моненсином. Процесс слияния протекает очень быстро, наступает спустя 5 мин после начала эндоцитоза. Для большинства клеток стадия переваривания веществ в лизосомах протекает спустя 30—60 мин после инициации эндоцитоза.

Эндоцитозные вакуоли у простейших можно назвать *прелизосомами*, поскольку они содержат некоторые лизосомные ферменты и имеют низкое значение pH. Эндосомы и вакуоли клеток животных (например, фибробласты), как правило, также имеют pH6 в матриксе везикул. Обработка клеток NH_4Cl блокирует указанные стадии пиноцитоза, в том числе пиноцитоз некоторых вирусов. Однако если клетки обрабатывать NH_4Cl , то спустя 3—4 мин после начала пиноцитоза вирусная инфекция не тормозится, поскольку после слияния эндосом и вакуолей с лизосомами происходит секреция нуклеокапсид в цитоплазму клеток.

Известно, что спектр флуоресценции гистонов резко изменяется в кислой среде. Если митотические клетки обрабатывать раствором гистонов при 37°C, то спустя 5—10 мин наблюдается изменение спектра флуоресценции, что указывает на слияние эндосом и (или) вакуолей с лизосомами. Тот факт, что содержимое эндосом и вакуолей имеет кислую реакцию, приводит к важному предположению: при интернализации из плазмалеммы в состав указанных органелл «отделяется» микродомен, содержащий либо H-насос, либо Na/H-ионообменник.

Эндосомы и вакуоли трудно дифференцировать по морфологическим критериям. Они практически не содержат гидролитических лизосомных ферментов и имеют короткий период жизни (минуты — часы), в то время как лизосомы живут более длительный период (30—60 сут). Эндосомы и вакуоли обладают более низкой плавучей плотностью (1,0—1,12 г/см³), чем лизосомы (~1,20 г/см³); значение рН внутри эндосом более высокое, чем в лизосомах (рН 4,5—5,0); первые менее чувствительны к ацидотропным веществам. При 16—20°C трансформация эндосом в лизосомы не происходит, поэтому клетки обогащаются эндосомами. Показано, что в одном перитонеальном макрофаге содержится 240 эндосом и 1000 вторичных лизосом. При этом площадь мембран эндосом составляет 10—15% площади плазмалеммы.

Ацидотропные (лизосомотропные) вещества — это, как правило, слабые основания (NH₄Cl, хлорохин, метиламин и др.). Они в недиссоциированной форме проникают через мембраны, внутри везикул в кислой среде протонируются, чем устраняют градиент рН и диссипируют H-насос в эндосомах, вакуолях, лизосомах, одетых везикулах, секреторных гранулах. Ацидотропные агенты имеют рК ~8,0 (если рК >8,0, то они плохо проникают в кислые компартменты клетки). Эти вещества вызывают снижение активности лизосомных ферментов, что необходимо учитывать при использовании катионных амфифильных лекарств (имипрамин, трифтазин, хлорохин и др.) при лечении так называемых лизосомных болезней накопления.

Слияние эндосом и вакуолей с лизосомами играет решающую роль в осуществлении защитной функции эндоцитоза. Ряд возбудителей тяжелых заболеваний (туберкулез и др.), проникая путем фагоцитоза в эндосомы, меняет свойства их мембраны, которые утрачивают способность сливаться с лизосомами. Патогенные вирусы способны размножаться в эндосомах и инфицировать клетку. *Mycobacterium tuberculosis* выделяют сульфатиды, модифицирующие мембрану эндосом и снижающие ее жидкость. Причиной торможения слияния может быть также действие NH₄⁺, полиглутамата, продуцируемых *M. tuberculosis*. Торможение слияния эндосом с лизосомами встречается при фагоцитозе не только бактерий, но и риккетсий, хламидомонад и грибов.

Все вещества, захватываемые в процессе эндоцитоза, сегрегируются в клетках в форме эндосом, вакуолей и других органелл в ходе их трансформации. Сегрегация необходима для последующего выведения токсических веществ из клетки, для ограничения их действия на метаболизм в клетке.

1.4. Механизмы эндоцитоза

Первая фаза эндоцитоза представляет собой *адсорбцию* веществ на гликокаликс плазмалеммы; она не зависит от метаболизма. В основе ее может лежать взаимодействие с фиксированными отрицательными зарядами (фосфатные группы кислых фосфолипидов и СООН-группы белков) самой плазмалеммы. В обычных условиях оба типа отрицательных групп, как правило, связаны с внеклеточным Ca^{2+} . При сорбции определенных веществ этими группами происходит вытеснение Ca^{2+} .

«Выключение» гликокаликса различных клеток путем блокировки анионных групп катионами металлов или обработкой нейраминидазой, проназой или гиалуронидазой не всегда приводит к однозначным результатам. Это указывает на гетерогенность и полифункциональность ионных групп гликокаликса. В тканевых клетках на поверхности нередко располагаются *микроворсинки* (цилиндрические структуры длиной 10—20 мкм и шириной 0,2—2,0 мкм), которые расположены либо регулярно, образуя щеточные каемки (клетки кишечника, почек), либо хаотично. Внешний слой мембран микроворсинок тоньше и менее плотен, чем внутренний, содержащий большее количество белков. Микроворсинки — район, где наиболее активно проявляется эндоцитоз путем адсорбции. Образование микроворсинок, псевдоподий отличается от формирования инвагинаций.

Более плотная упаковка белковых субъединиц мембраны при понижении гидрофильности способствует образованию псевдоподий (наружных выростов цитоплазмы). Если же плотность упаковки понижается, а гидрофильность увеличивается, то мембрана влячивается и образуются складки. Осмотическое давление в клетке значительно выше, чем снаружи. Поэтому легко понять образование цитоплазматических выростов, труднее понять образование влячиваний.

В определенных точках плазмалеммы прочность мембраны может уменьшаться либо в связи со структурными перестройками, либо в результате изменения поверхностного натяжения мембраны. В таком случае образующиеся выросты замыкаются и происходит слияние мембран — возникают эндосомы. *Выросты и влячивания* — динамические структуры, быстро образующиеся (меньше чем за 1 с), но недолго существующие. Псевдоподии морфологически разделяются на лопастные или пальцевидные (толщина от 50 до 200 нм); пластинчатые (в виде вуалей); пузырьковидные или четкообразные; нитевидные или филоподии, иногда образующие микрошипы.

Нитевидные псевдоподии — своеобразные «органы чувств», распознающие состав внеклеточной среды, прикасаясь и прилипая ко всем препятствиям (веществам или к обломкам клеток). Они могут служить средством прикрепления клеток к различным поверхностям.

Псевдоподии образуются из эктоплазмы. Пузырьковидные псевдоподии представляют собой мелкие пузырьки на коротенькой ножке или без нее. Они очень быстро образуются и так же быстро исчезают, при этом создается впечатление «вскипания» определенного участка плазмалеммы. Это явление часто наблюдается при митозе в области перегородки между двумя дочерними клетками. Иногда пузырьки насаживаются друг на друга в виде четок (почкование). Пузырьковидные псевдоподии в отличие от остальных псевдоподий состоят из эндоплазмы. Четкообразные пузырьки не всегда возвращаются в клетку в отличие от одиночных, маленьких «вскипающих» пузырьков. Микрошипы подвижны, движения их волнообразны, длина невелика (< 1 мкм). Некоторые из них содержат твердый центральный стержень. Микрошипы могут втягиваться обратно в клетку, в этом случае происходит разборка стержня.

Образование *инвагинаций*, т. е. углублений, впячиваний шириной до 20 нм, глубиной до 50—80 нм, и втягивание их в цитоплазму в случае фагоцитоза и макропиноцитоза чувствительно к ингибиторам метаболизма и низкой температуре, т. е. представляет собой активный *энергозависимый процесс*. В частности, ингибиторы гликолиза (NaF, моноиодацетат), дыхания (KCN, NaN_3), разобщители окислительного фосфорилирования (2,4-динитрофенол) эффективно блокируют указанные процессы. В связи с этим эндоцитоз можно рассматривать как своеобразный *аналог активного транспорта веществ* через мембрану. При гипоксии клеток, создаваемой с помощью 2-дезоксиглюкозы, также снижается эндоцитоз. Наиболее чувствителен к снижению АТФ в клетках фагоцитоз, затем адсорбционный и менее жидкофазный пиноцитоз.

Возле эндоцитирующих участков плазмалеммы отмечают скопление митохондрий. Действительно, *макроэндоцитоз* (в большей степени фагоцитоз) сопровождается усилением биоэнергетических процессов, ресинтезом мембранного материала, который «тратится» на образование эндосом вакуолей.

Процессу слияния мембран при эндоцитозе (как, впрочем, и экзоцитозе) может предшествовать увеличение обновления фосфолипидов, при этом мембрана в зоне слияния становится более «текучей». Известно, что мембраны только что сформировавшихся фагосом обладают большей текучестью, чем участки плазмалеммы, из которых они образованы.

Специфический фагоцитоз в фагоцитах, лейкоцитах в отличие от факультативного в фибробластах, нейронах, эпителии сопровождается резким увеличением дыхания (в 2—3 раза), продукции H_2O_2 , активацией перекисного окисления липидов, окис-

лением глюкозы в пентозном цикле (в 2—10 раз). Лейкоциты, инкубированные в присутствии колхицина или в отсутствие O_2 , фагоцитируют нормально, но фагосомы двигаются хаотично и увеличение гликолиза не наблюдается. Усиление окислительной активности при фагоцитозе объясняется активацией НАДН- и НАДФН-зависимых оксидаз плазмалеммы, которые превращают O_2 в H_2O_2 и супероксидный анион.

Фагоцитоз сопровождается увеличением включения лизоформ фосфолипидов в лецитин и фосфатидилэтаноламин, ^{32}P в фосфатидную кислоту и фосфатидилинозит; увеличением свободных жирных кислот; некоторым увеличением содержания лецитина в плазмалемме (за счет активации синтеза лецитина). Спустя 6—10 ч после начала фагоцитоза в клетках отмечено увеличение содержания холестерина и фосфолипидов.

В 70-е годы широкое распространение получила *механо-химическая гипотеза эндоцитоза* (рис. 5). Она опиралась на факты локализации в эктоплазме (см. рис. 2) цитоскелетных фибриллярных структур (микротрубочек, промежуточных филаментов, актиновых микрофиламентов и миозиновых фибрилл), состав-

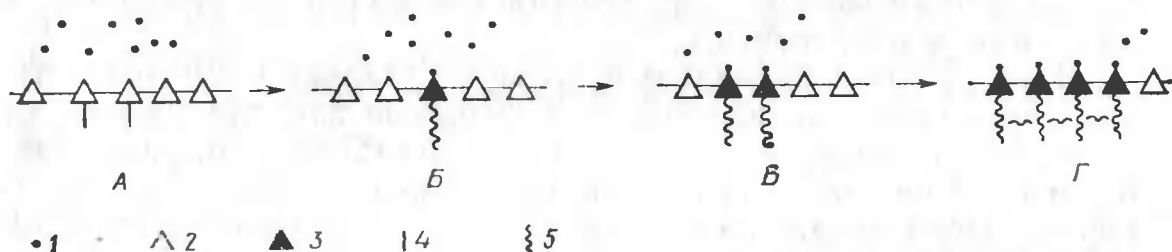


Рис. 5. Механо-химическая схема фагоцитоза. А — Г — последовательные стадии фагоцитоза:

1 — лиганд, субстрат, сорбент; 2 — неактивный избирательный (или неизбирательный) рецептор плазмалеммы; 3 — активный рецептор в комплексе с лигандом (в этом случае изменяется как конформация самого рецептора, так и его микроокружения), 4 — элементы цитоскелета, связанные с рецептором (находятся в состоянии расслабления), 5 — элементы цитоскелета, связанные с рецептором (находятся в состоянии сокращения)

ляющих примембранный слой (до 100 нм) внутренней поверхности практически всех плазматических мембран. Данный слой состоит из сети нитей, пучков фибрилл цитоскелета. Эти структуры, ассоциированные с мембраной, определяют гибкость, эластичность, ундуляцию некоторых участков мембраны, степень погруженности, интернализации различных белков в липидный бислой, кластеризацию определенных белков, рецепторов. Эндоцитоз наиболее выражен у тех клеток, в составе эктоплазмы которых содержится больше всего элементов цитоскелета. Эндоцитоз наиболее выражен у клеток с высокой подвижностью, которая проявляется не только в амебоидном движении, но и в образовании псевдоподий и пр.

Согласно *контрактивной гипотезе эндоцитоза* процесс протекает по схеме: энергонезависимая сорбция поглощаемого материала плазмалеммой → изменение под влиянием сорбированно-

го индуктора физико-химических свойств отдельных участков мембраны → АТФ-зависимое сокращение элементов цитоскелета в данном участке плазмалеммы → образование инвагинации (в том числе и псевдоподий). С помощью электронного микроскопа в районе инвагинации выявляется особое сгущение разнообразных элементов цитоскелета. Стабилизирующим и цементирующим элементом в данном случае являются микротрубочки, динамичным — система актиновых микрофиламентов и миозиновых фибрилл. Гистохимически в эндосомах и в районе образования инвагинаций выявляется АТФаза. Образование псевдоподий коррелирует с образованием агрегатов актиновых микрофиламентов. Пиносомы (диаметр d — 0,1—0,3 мкм) макрофагов, фибробластов, которые быстро захватывают растворимую пероксидазу, содержат «одежду» из филаментозных, сократительных белков.

Обработка клеток цитохалазином В и в меньшей степени колхицином приводит к значительному торможению фагоцитоза и макропиноцитоза. Такого рода эксперименты выявили еще одну интересную особенность. Миграция эндосом от периферии к центру клетки зависит от функционирования цитоскелета, в частности, микротрубочек.

Жидкофазный пиноцитоз в культуре гладких миоцитов артерий тормозится колхицином. Эндоцитозные вакуоли мигрируют к перинуклеарному району. Колхицин ингибирует миграцию вакуолей и приводит к хаотическому движению органелл в цитоплазме. Образование пиносом в макрофагах зависит от температуры, угнетается цианидом, динитрофенолом, олигомицином и антимицином А. Пиноцитоз в этом случае нуждается в аэробном дыхании и окислительном фосфорилировании, тогда как миграция пиносом в цитоплазме при этих воздействиях не изменяется.

Действие *цитостатиков* на эндоцитоз не всегда приводит к однозначному результату. Так, цитохалазин В, вызывающий разборку актиновых микрофиламентов, желатинизацию актина, тормозит жидкофазный пиноцитоз сахарозы гепатоцитами, пероксидазы — макрофагами, но не влияет на адсорбционный пиноцитоз ферритина или коллоидного золота макрофагами.

Регуляторами контрактильной системы являются АТФ и Ca^{2+} . В связи с этим интересно проследить корреляцию между их действием на эндоцитоз и модельные сократительные системы. Большая серия опытов выполнена на амебах. Обнаружено, что индукторы пиноцитоза вызывают резкое снижение сопротивления поверхностного натяжения мембраны, снижение трансмембранного потенциала, набухание мембран. В период индукции пиноцитоза прекращается амебоидное движение цитоплазмы, обусловленное функционированием сократительных белков. Аналогичный эффект обнаруживается при добавлении АТФ и ЭДТА. Отсюда становится ясно, что возможной причиной остановки движения может быть высвобождение ионов Са под влиянием индукторов из плазмалеммы, так как кальций при участии

АТФ способствует переходу контрактильной системы в цитоплазме из состояния золь в состояние геля. В условиях повышенного давления пиноцитоз подавляется, очевидно, вследствие превращения золь→гель в примембранной области.

Ионы Са при увеличении концентрации от 0,01 до 1,0 мМ усиливают пиноцитоз у амёб, а начиная с концентрации выше 1 мМ ингибируют этот процесс. Ионы Mg с повышением концентрации выше 1 мМ прогрессивно индуцируют пиноцитоз. Замечено, что индукторы пиноцитоза вытесняют Ca^{2+} из плазмалеммы и, возможно, дают сигнал к входу Ca^{2+} из внеклеточной среды в клетку и (или) высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточного депо хранения. Облегчают индукцию пиноцитоза ионы К, Rц, UO_2 , декаметоний, рутениевый красный, тетраметиламмоний.

Таким образом, схема событий при пиноцитозе у амёб такова. Индуктор взаимодействует с отрицательно фиксированными группами гликокаликса или плазмалеммы. В результате снижается поверхностный потенциал, содержание Ca^{2+} , связанного с гликокаликсом, усиливается пассивный вход Ca^{2+} в клетку. Возможно, что конкурентное вытеснение мембранно-связанного Ca^{2+} индукторами пиноцитоза приводит к дестабилизации мембраны, изменению ее конформации, открытию Са-каналов, т. е. к каскадному усилению процессов, ведущих к инвагинации и везикуляризации. Накопление Ca^{2+} в цитоплазме запускает сократительную систему, регулирующую образование инвагинаций и везикуляризации.

Клеточная мембрана может спонтанно осциллировать, т. е. постоянно, хаотично изменять профиль своей поверхности, ундулировать, изгибаться, образовывать разнообразные инвагинации. Центр осцилляции (он может быть «блуждающим») создается там, где на определенном участке внутренней поверхности плазмалеммы больше всего элементов цитоскелета, где в определенный момент времени больше всего локальная концентрация АТФ (1—5 мМ) и Ca^{2+} (1—5 мкМ) — регуляторов сократительной системы белков. Волна осцилляции может распространяться (за счет генерализованного структурного сдвига в мембране) и самоусиливаться или ослабляться. При спонтанной осцилляции мембран может происходить случайный захват внеклеточного материала. При индуцированном эндоцитозе создается новый, мощный центр осцилляции мембран со всеми вытекающими последствиями.

В процессе везикуляризации большую роль играет слияние контактирующих гомологичных мембран. Предполагают, что на этой стадии активируется Са-зависимая фосфолипаза A_2 плазмалеммы. Лизоформы фосфолипидов, возникшие при активации фермента, образуют мелкие сферические мицеллы, дестабилизирующие липидный бислой. В этих участках мембрана становится более подвижной и лабильной, доступной для слияния (см. гл. 4). Для образования замкнутой эндосомы вновь необходима стабильность бислоя и активация ацилтрансфераз фосфолипидов.

Поскольку холестерин также является модификатором мембранного бислоя, изменение его содержания в мембране сильно влияет на скорость протекания эндоцитоза.

Из некоторых клеток (макрофаги, фибробласты, лейкоциты, простейшие и др.) можно выделить фракции пиносом или фагосом. Эти фракции содержат различные вакуоли и везикулы как структурные элементы трансформации захваченных веществ. Показано, что белковый и липидный состав эндосом и плазмалеммы имеет много общего; интегральные белки плазмалеммы не участвуют в формировании инвагинаций и образовании эндосом.

Микропиноцитоз обнаружен для многих тканевых клеток. Нижний предел диаметра пиносом (60—130 нм) в данном случае обусловлен минимально возможной кривизной плазмалеммы при ее инвагинации. Особенно характерен микропиноцитоз для клеток эпителия и эндотелия. Многие клетки могут поглощать вещества с помощью как макро-, так и микропиноцитоза. На долю микропиноцитоза у макрофагов приходится около 80% общей величины эндоцитоза. Микропиноцитоз различных веществ и частиц неспецифичен и нечувствителен к низкой температуре и ингибиторам биоэнергетических процессов. Возможными эффективными индукторами микропиноцитоза являются факторы, вызывающие перекисное окисление липидов: ионизирующая радиация, ультрафиолет.

Увеличение перекисного окисления липидов в мембранах приводит к искажению ориентации упорядоченного липидного бислоя и изгибанию отдельных участков мембраны. На липосомах показано, что оксиданты индуцируют инвагинацию, везикуляризацию и агрегацию искусственных фосфолипидных мембран, а антиоксиданты устраняют эффект оксидантов. Феномен *перекисного окисления липидов* в эндоцитозе не является исключительным. Он вносит свой вклад также в индукцию энергозависимого макроэндоцитоза, облегчая образование инвагинаций и слияние мембран за счет ее дестабилизации. Фагоцитоз полиморфноядерных лейкоцитов сопровождается усилением перекисного окисления липидов и свободнорадикальных процессов, снижением эндогенной антиоксидантной активности плазмалеммы (снижением активности супероксиддисмутазы).

1.5. Рециклизация мембран

Новообразование мембран, кругооборот материала плазмалеммы в ходе цикла эндо- и экзоцитоза, в транспорте макромолекул (везикул) от плазмалеммы к центру, к системе ГЭРЛ и обратно принято называть *рециклизацией мембран*. Значение времени полужизни для мембранных структур (τ_{50}) определяется в диапазоне 10—100 ч, хотя известны быстрообновляющиеся компоненты с τ_{50} в несколько часов. Рециклизация — основной путь обновления плазмалеммы. В этом случае для большей час-

ти мембранных белков и других компонентов мембран характерны практически одинаковые значения τ_{50} .

Часть клеточной мембраны интернализируется, т. е. подвергается эндоцитозу, с гораздо большей скоростью (почти в 10 раз), чем претерпевает полный распад. Не вся эндоцитированная мембрана разрушается под действием лизосомных ферментов. Значительная часть компонентов повторно включается в состав плазмалеммы, т. е. рециклируется. В одном случае от эндосомы или вакуоли отделяется небольшой пузырек, который вновь сливается с плазмалеммой; в другом случае то же самое происходит с первичной и вторичной лизосомами (см. рис. 4, 6). В обоих случаях восстанавливается исходная площадь клеточной мембраны и снижается скорость деградации последней. Установлено, что матрикс эндосом при рециклизации практически не меняется, т. е. избирательно удерживается внутри оставшихся эндосом.

У макрофагов плазмалемма заменяется за 33 мин, у опухолевых фибробластов — каждые 2 ч периода эндоцитозной активности, при этом обновляется 10—20% объема клеток. Цитоскелетные структуры эктоплазмы обеспечивают рециклизацию мембран, подтягивая к внутренней стороне плазмалеммы различные везикулы, после чего происходит слияние и слияние (как и в случае экзоцитоза).

Если плазмодий миксомицета проткнуть стеклянным капилляром, то «дырка» в мембране «залечивается» в течение нескольких секунд. Многочисленные везикулы плазмы собираются возле «дырки», образуя уплощенные вакуоли, которые располагаются параллельно наружной поверхности обнаженного участка. После слияния этих микровезикул образуется новая плазмалемма.

Обновление плазмалеммы происходит постоянно как при экзоцитозе, так и при *эндоцитозе после экзоцитоза* (см. разд. 2.6), при повреждении клеток. Мембранная система ГЭРЛ регулирует постоянный кругооборот мембранных структур от цитоплазмы к поверхности клеток при экзоцитозе, от плазмалеммы внутрь цитоплазмы при эндоцитозе. При делении клеток митоти-

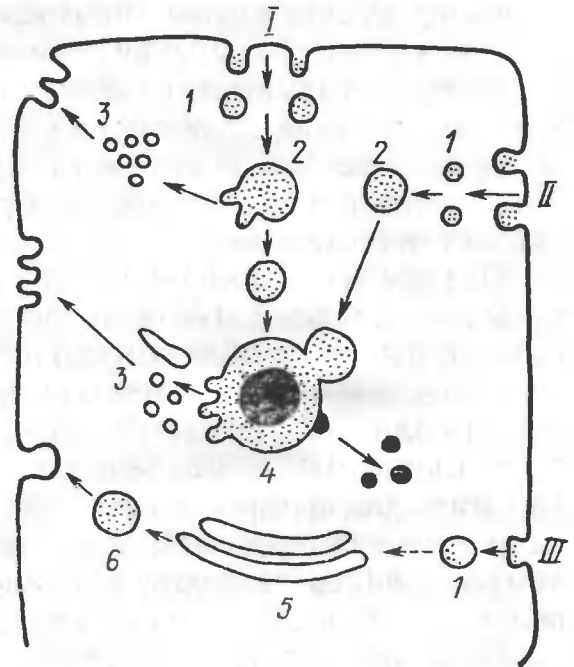


Рис. 6. Пути рециклизации мембран. I—безлизосомной рециклизации; II—лизосомной рециклизации; III—рециклизации через аппарат Гольджи с последующим экзоцитозом секреторных гранул:

1 — эндосома, 2 — эндоцитозная вакуоль (крупная эндосома), 3 — рециклизирующие мелкие пузырьки, 4 — вторичная лизосома, 5 — аппарат Гольджи, 6 — секреторная гранула

ческое веретено оттесняет от системы ГЭРЛ к периферии клетки образовавшиеся при митозе многочисленные мелкие везикулы. Видимо, эти везикулы сливаются с плазмалеммой, резко увеличивая ее поверхность при делении исходной клетки надвое. Таким образом, кругооборот мембранных структур сопряжен с процессами экзоцитоза и эндоцитоза и связывает воедино мембранную систему ГЭРЛ с секреторными гранулами и плазмалеммой. Это сопряжение обеспечивает относительное постоянство площади общей поверхности мембран клеток в течение определенного времени.

В ходе фагоцитоза макрофаги быстро теряют (до 50%) плазмалемму за счет везикуляризации, так что спустя некоторое время эти клетки больше не способны к фагоцитозу. Например, τ_{50} интернализации для 5'-нуклеотидазы плазмалеммы равно 2 ч. Содержание холестерина и фосфолипидов в ходе фагоцитоза не изменяется. В последующие 5—10 ч после фагоцитоза наблюдаются рециклизация мембран и восстановление фагоцитозной активности.

Макрофаги и фибробласты содержат два типа включения меченых соединений. Первый тип характеризует малые пиносомы с очень быстрым обменом вещества, т. е. с последующим его выведением из клетки путем экзоцитоза (для макрофагов τ_{50} — 5 мин, для фибробластов — 6—8 мин). Второй тип — это крупные пиносомы с медленным обменом (для макрофагов τ_{50} 180 мин, для фибробластов 430—620 мин). Эти клетки захватывают вещество нелинейно во времени. Данный факт объясняется тем, что часть пиносом, слипаясь с плазмалеммой, секретирует вещество обратно во внешнюю среду.

При пиноцитозе площадь плазмалеммы уменьшается, это установлено при помощи электронной микроскопии. У макрофагов за 1 ч жидкофазного пиноцитоза пероксидазы объем клеток снижается на 25%, а площадь мембран — на 186%; при этом объем клеток и площадь мембран пиносом и вторичных лизосом составляет 2—3 и 15—20%, соответственно, от величин, характерных для контрольной клетки (до пиноцитоза). Эффект сохраняется в течение 3 ч пиноцитоза, что указывает на синхронный процесс восстановления плазмалеммы на стабильном уровне.

Расход плазмалеммы при эндоцитозе довольно быстро компенсируется за счет встраивания (слияния) в клеточную мембрану различных везикул и вакуолей, «опустошенных» эндосом, «отработанных» лизосом, секреторных гранул. У амебы нет выраженной вызванной секреции, поскольку за 20—30 мин интенсивного индуцированного пиноцитоза этой клетке необходимо не менее 4 ч для восстановления израсходованной поверхности, и в этот период никакие индукторы не вызывают пиноцитоз. В то же время «покоящейся» амебе, т. е. при спонтанном пиноцитозе, для полной регенерации плазмалеммы без изменения своего объема требуется 8—12 ч. При индуцированном пиноцитозе амеба приобретает округлую форму, движение ее прекращается и на по-

верхности во многих местах возникают псевдоподии. В ходе спонтанного пиноцитоза амeba двигается и имеет типичную вытянутую форму: передняя часть — гладкая, задняя — волнистая, с псевдоподиями; при этом расходуется до 0,2% плазмалеммы за 1 мин и столько же восстанавливается за счет обратного процесса — экзоцитоза.

Таким образом, с одного конца амeba спонтанным эндоцитозом непрерывно «поедает» свою мембрану, а с другого (в переднем конце) — непрерывно ее «наращивает» за счет экзоцитоза вакуолей, продуцируемых аппаратом Гольджи. Амебоидное движение регулирует восстановление мембран. Главное, что обновление плазмалеммы любых клеток происходит путем одновременного функционирования двух противоположно направленных процессов — эндоцитоза и экзоцитоза.

В основе спонтанного и индуцированного пиноцитоза, вероятно, лежат одинаковые механизмы, поскольку спонтанный пиноцитоз может своеобразным образом индуцироваться как «включением» механо-химических факторов внутри клетки, так и «выключением» внешних факторов — за счет способности гликокаликса концентрировать катионы из окружающей среды. При спонтанном эндоцитозе клетка поглощает любые вещества из внешней среды. Клетки могут поглощать значительную часть своей плазмалеммы (до 50% поверхности за 1 ч) благодаря всем трем типам эндоцитоза.

Пока остается неясным механизм рециклизации мембран. Объяснить его одним лишь механизмом обратного слияния мембран на различных стадиях эндоцитоза затруднительно, главное найти пути регуляции этих процессов.

Слияние контактирующих мембран при эндо- и экзоцитозе — фактор обновления, роста и дифференцировки плазмалеммы. Так, при увеличении содержания соли (NaCl) в пище объем мембран некоторых железистых клеток птиц за короткое время увеличивается в 100 раз. В этих опытах было показано, как происходит встраивание Na, K-АТФазы в плазмалемму: сначала субъединицы фермента синтезируются в мембранах ЭПР, затем олигомер формируется в аппарате Гольджи, от цистерн которых отделяются маленькие везикулы, содержащие Na, K-АТФазу, эти микровезикулы затем сливаются с плазмалеммой, пополняя ее запасы Na, K-АТФазой.

Различные компоненты нейрональных мембран, и особенно синаптических, поступают в нервные окончания из тела нейрона по аксону (или дендриту) с аксональным током. Эти компоненты формируются в системе ЭПР — аппарат Гольджи. Раздельная доставка веществ, различные размеры везикул, различие из физико-химических свойств объясняют большую вариабельность объема и скорости быстрого компонента аксотока (400—500 мм/сут и выше).

Таким образом, можно различить три пути рециклизации мембран. Первый путь — безлизосомная рециклизация. Она про-

текает быстро, в течение нескольких минут после начала эндоцитоза за счет слияния с плазмалеммой эндосом и вакуолей или отпочковавшихся от вакуолей мелких везикул. Процесс сопровождается «возвратом» во внешнюю среду части захваченного материала. Данный путь убедительно доказан у простейших. Второй путь — *лизосомная рециклизация*, при этом вторичная лизосома или отделившиеся от нее мелкие везикулы сливаются с плазмалеммой. Такой тип, например, показан для макрофагов, которые фагоцитировали комплекс латекса с ^{131}I -лактопероксидазой: спустя 5—10 мин после эндоцитоза 80% метки возвращалось в плазмалемму из вакуолей (первый тип рециклизации) и лишь спустя 30 мин часть метки рециклизовалась из лизосомного фонда. Третий путь — *сочетание эндо- и экзоцитоза через аппарат Гольджи*. Данный путь также сопряжен с рециклизацией секреторных гранул.

Рециклизация мембран — фактор устойчивости и стабильности эндоцитоза в течение жизненного цикла клеток. Рециклизация эффективнее происходит в ходе пиноцитоза и специфического эндоцитоза, чем при фагоцитозе.

Перитонеальные макрофаги мышей и клетки амеб каждый час обновляют 20—25% своего клеточного объема. Фибробласты в культуре ткани обменивают 25% клеточного объема каждые 3—6 ч. Учитывая, что объем лизосом в этих клетках мал и скорость жидкофазного пиноцитоза сравнительно постоянна для этих культуральных клеток, скорость рециклизации мембран оказывается высокой и возвращение внеклеточного материала (иногда в преформированном виде) возможно в ходе рециклизации путем экзоцитоза. Макрофаги и L-клетки фибробластов восстанавливают плазмалемму каждые 33 и 120 мин соответственно.

На макрофагах был поставлен эксперимент по изучению жидкофазного пиноцитоза пероксидазы (в течение 2 ч). При этом при помощи стереологической электронно-микроскопической техники измеряли объем и площадь мембран клеток, пиносом и вторичных лизосом. Оказалось, что изменение соотношений объема или площади мембран органелл с соответствующими параметрами клетки в процентах отчетливо делится на две фазы. В *первую фазу* (3—5 мин после начала пиноцитоза) наблюдали резкое увеличение относительного объема (до 2,5%) и площади мембран (до 12—13%) эндосом, вторичные лизосомы практически не возникали. В эту фазу образовывались пиносомы, часть их сливалась с плазмалеммой, но деградация их не наблюдалась. Процесс рециклизации плазмалеммы происходит быстрее, чем процессы деградации эндосом. Повторный пиноцитоз с другим маркером в этот период сразу после введения пероксидазы приводит к образованию новых пиносом с «новым» маркером; пиносомы, содержащие «старый» маркер, не нагружаются «новым». Таким образом, рециклизация начинается до стадии слияния эндосом с лизосомами.

Вторая фаза (через 5—45 мин) характеризуется тем, что указанные показатели для пиносом, достигнув максимального в первой фазе значения, далее почти не изменяются, а параметры для вторичных лизосом, медленно, но значительно увеличиваются до 2,5 и 17—18% соответственно. Эта фаза характеризуется резким усилением процессов деградации захваченного материала, образованием вторичных лизосом, однако и процессы рециклизации не прекращаются, а иногда и возрастают за счет слияния вновь образующихся эндосом и вторичных лизосом в этот период с плазмалеммой. Вторая фаза далее стабилизируется на описанном уровне в течение 2 ч.

Белки плазмалеммы, участвующие в образовании мембран эндосом, сами не подвергаются быстрой деградации, а значение t_{50} составляет 10—80 ч, в то время как t_{50} для содержимого эндосом $< 2-3$ ч.

Плазмалемму и мембрану эндосом клеток яичников китайского хомячка (типичный объект исследований такого рода) метили ^{131}I -лактопероксидазой, при этом обработка клеток протеиназой способствовала распаду меченых белков плазмалеммы, но не мембран эндосом. Однако если промытые меченые клетки вернуть в культуральную среду, преинкубировать 10 мин и затем снова обработать протеиназой, то значительная часть метки солюбилизируется. Эти факты можно интерпретировать так, что протеиназа подействовала на меченые белки плазмалеммы в результате рециклизации, т. е. за счет возврата части мембранных структур из эндосом в плазмалемму. При рециклизации в принципе возможна секреция содержимого эндосом, вторичных лизосом и других везикул. Однако при этом содержимое не должно «перевариваться» внутри клетки.

Таким образом, процесс рециклизации клеточных мембран можно охарактеризовать как *феномен экзоцитоза после эндоцитоза*. Эндоцитоз усиливает формирование в аппарате Гольджи мелких везикул, которые сливаются с вновь образованными эндосомами, после чего происходит экзоцитоз с частичным выбросом захваченного материала. Кроме того, в ходе пиноцитоза в системе эндосомы — вакуоли происходит неспецифическая сортировка материала. При рециклизации мембран около 30—50% захваченного материала из эндосом, вакуолей уже в ходе экзоцитоза выбрасывается за пределы клетки.

1.6. Трансцитоз (межклеточный транспорт веществ)

Некоторые клетки, захватывая вещества путем эндоцитоза, переносят их в эндосомах без трансформации в цитоплазме или с небольшой модификацией к другой стороне (части) клетки. Там эндосома сливается с плазмалеммой и секретирует это вещество во внеклеточную среду рядом с другой клеткой (или слоем клеток), которая захватывает его путем эндоцитоза.

Такой феномен получил название *трансцитоз*, он имеет отношение к межклеточному транспорту веществ, к обмену макромолекул между клетками. Таким образом, трансцитоз представляет собой сочетание эндоцитоза (чаще всего пиноцитоза) и экзоцитоза одного и того же вещества в одной и той же клетке. Благодаря этому вещества могут поступать в определенные ткани, преодолевая тканевые барьеры.

Явление трансцитоза обнаружено при движении белков плазмы через эндотелий капилляра (кровь — эндотелий — клетка или межклеточная среда), транспорте IgG через эпителиальный слой печени и молочной железы. В ходе трансцитоза также наблюдается рециклизация плазмалеммы. Эндотелий капилляров способен в обоих направлениях между плазмой крови и внеклеточной жидкостью осуществлять быстрый обмен макромолекулами путем пиноцитоза или путем диффузии через межклеточные щелевидные контакты. Клетки эндотелия образуют гладкие эндосомы для системы трансцитоза и обычные эндосомы с трансформацией в лизосомах. По одним данным, клетки эндотелия содержат 10^4 гладких эндосом ($d=500-1000$ нм), которые занимают 10% клеточного объема и обеспечивают трансцитоз, по другим — многочисленные мелкие гладкие эндосомы ($d=60-70$ нм) составляют 30—40% клеточного объема эндотелия и осуществляют быстрый транспорт веществ менее чем за 1 мин.

В кишечном эпителии транспорт IgG происходит путем специфического эндоцитоза через Fc-рецепторы и образование одетых везикул. IgG захватывается ресничками на апикальной поверхности и переносится на базолатеральную поверхность клеток, рецепторы рециклизируются в виде везикул, т. е. возвращаются на апикальную поверхность. Если клетки эпителия инкубировать с пероксидазой и лигандом (комплекс ферритина и IgG), то оба вещества включались в апикальную часть клеток. Пероксидаза в составе эндосом включалась в лизосомы, но не мигрировала через всю клетку, а второе вещество, минуя лизосомы, достигало базолатеральной поверхности. Сам ферритин, как и пероксидаза, неспецифически адсорбировался клеткой жидкофазным пиноцитозом, часть его разрушалась в лизосомах, а другая — передвигалась в составе эндосом через всю клетку.

Для многих гетерологичных клеточных систем (кровь — эпителий — другая клетка, кровь — глия — нейрон, среда — нейрон₁ — нейрон₂ и др.) доказан межклеточный перенос различных макромолекул. Как уже отмечалось, это путь для преодоления различных гистогематических барьеров. Например, клетки астроцитов синтезируют нейроспецифический белок S-100, который затем поступает в нейрон, где он осуществляет свои функции. Также известно, что сателлитные клетки глии адреnergических нервов синтезируют фактор роста нерва, который далее поступает в аксон и тело нейрона, где и регулирует рост

нервов. Известно, что нейроны могут секретировать ацетилхолинэстеразу, которая далее попадает в капилляры, особенно в зоне с полным или частичным отсутствием гематоэнцефалического барьера (ядра шва, *area postrema*, синее пятно, черная субстанция).

Существуют доказательства транснейронного переноса макромолекул в зрительных путях и гиппокампе мозга как в синаптических, так и в несинаптических участках контактирующих нейронов, а также доказательства нейротканевого и глио-нейронного переноса макромолекул путем эндоцитоза.

В опытах с перевязкой аксона показано, что везикулы, вакуоли, тубулярные структуры ЭПР транспортируются вдоль по нейрону в прямом и обратном направлениях и без включения внутрь экзогенных маркеров. Это указывает на контейнерный (в форме везикул) путь переноса макромолекул от центра к периферии и, наоборот, без трансформации веществ. Например, пероксидаза, захваченная перикарионом нейрона, попадает в эндосомы и, минуя систему ГЭРЛ, с прямым медленным аксотоком (1,5 мм/сут) переносится в терминали. Другой пример: ацетилхолинэстераза, синтезируясь как белок в теле нейрона, мигрирует в терминаль с медленным аксотоком как растворимая форма фермента и с быстрым аксотоком в везикулах.

В терминалях ацетилхолинэстераза поступает в состав аксолеммы и пресинаптической мембраны холинергических нейронов и может далее путем экзоцитоза секретироваться в синаптическую щель и затем встраиваться в постсинаптическую мембрану.

В связи с транцитозом необходимо кратко упомянуть идею о *межтканевом транспорте генетического материала* (ДНК), которая возникла в 60—70-е годы. Клетки костного мозга секретируют фрагменты ДНК в кровоток, далее ДНК может поступать путем эндоцитоза в быстро регенерирующие клетки (например, в печень). После инъекции животным экзогенной ДНК в кровь она встраивается каким-то образом в ДНК реципиента, причем, очевидно, это путь эндоцитоза, так как этот процесс происходит и на фоне ингибитора синтеза ДНК — оксимочевины. Клетки захватывают экзогенную ДНК (как низкомолекулярную, так и высокополимерную), но захват нативной ДНК происходит эффективнее по сравнению с денатурированной. Не только гомологичная, но и гетерологичная ДНК, инъецированная животным, может встраиваться в геном реципиентов, что сопровождается появлением генетических признаков донора. Предполагают, что встраивание экзогенных фрагментов в ДНК клеток-реципиентов может происходить лишь при наличии предсуществующих разрывов полинуклеотидной цепи. Индукция дополнительных разрывов, очевидно, может обеспечить еще большую эффективность эндоцитоза фрагментов ДНК из плазмы крови в клетки-мишени и затем в ДНК клеток-реципиентов. В 1984 г. появились работы, свидетель-

ствующие о том, что вышеописанный феномен может быть *новым способом репарации ДНК*.

1.7. Эндоцитоз и межклеточные контакты

В синапсах с электрической передачей возбуждения в области щелевидных контактов по обе стороны мембран встречаются везикулы, крупные вакуоли пиноцитозного характера. При возбуждении нервов эти везикулы динамично изменяют свой объем, форму. Предполагают, что в районе щелевидных контактов происходит регулярный, взаимный межклеточный транспорт веществ.

Щелевидные контакты включают агрегаты из рецепторов пептидных гормонов и аденилатциклазы, эти контакты регулируют прямой обмен между клетками с низким сопротивлением и транспорт ионов и малых молекул ($\leq 1,2$ кД). Щелевидные контакты в клетках зернистого слоя преовуляторных фолликулов часто вовлекаются внутрь посредством процесса, включающего инвагинацию одной клетки в другую вблизи контакта, с последующим формированием сложной эндосомы с двойной мембраной; в них выявляются кольцевые щелевидные мостики (рис. 7). Такие сложные эндосомы обнаруживаются чаще всего в тканях, которые используют в качестве мишени гормоны, опосредующие свое действие в клетке через систему цАМФ.

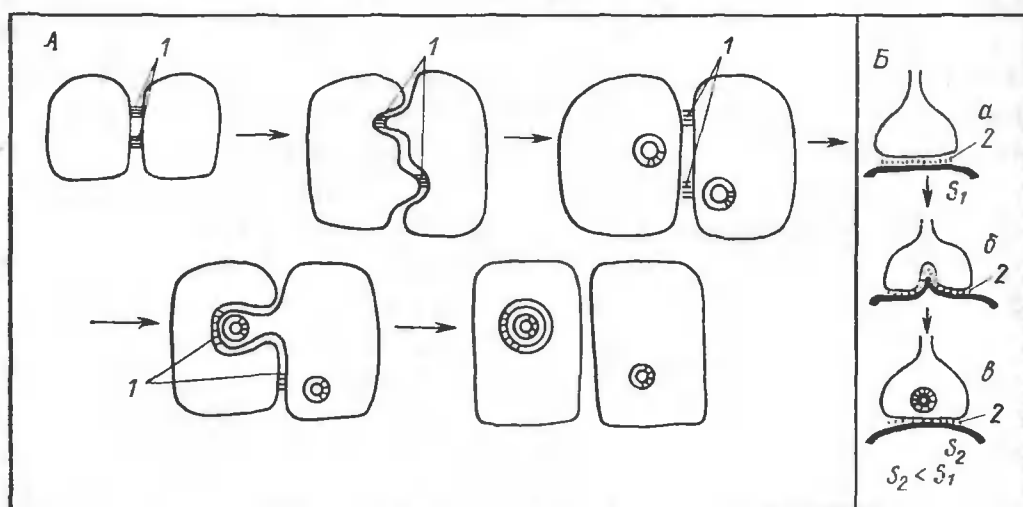


Рис. 7. Трансформация щелевидных контактов (А) и образование спинул в аксо-дендритном синапсе (Б):

1 — щелевидные контакты между контактирующими мембранами, 2 — внесинаптические филаментозные нити в синаптической щели; а — исходное состояние, б — микрофагоцитоз и образование спинул, в — образование сложных эндосом с двойной мембраной; S_1 и S_2 — ширина активной зоны синапсов

Щелевидные мостики между соседними клетками могут быть местом взаимного микрофагоцитоза. Это также путь для прямых и обратных трофических влияний между клетками.

В некоторых клетках (например, для соседствующих нейронов и глии спинно-мозговых ганглиев) даже при отсутствии щелевидных контактов описан взаимный микропиноцитоз.

В последнее время установлено, что фагоцитоз в нервной ткани протекает и в норме. Возможны четыре варианта фагоцитоза: 1) нормальный нейрон отторгает куски патологической клетки при дегенерации; 2) патологическая клетка поглощает «здорового соседа»; 3) нормальный нейрон фагоцитирует здоровую клетку (например, в раннем онтогенезе, в зрелом мозге); 4) патологическая клетка фагоцитирует поврежденную гипоксией, интоксикацией, дегенерацией клетку. Фагоцитоз в норме может осуществлять обмен информационными макромолекулами между клетками. Возможно, что захваченные денатурированные белки «мертвых» дегенерирующих фрагментов могут вызывать аутоиммунные реакции. Трофический обмен макромолекулами и интенсивный фагоцитоз в системе нейрон — глия носят двусторонний характер. Известны многочисленные факты фагоцитарной роли глии при дегенерации нервов, в раннем онтогенезе. Однако описан и микрофагоцитоз нейронами участков глии, например, при аноксии.

Рост отростков нейрона и их ветвлений, как правило, сопровождается усилением эндоцитоза в этой зоне. В данном случае эндоцитоз обеспечивает возросший уровень метаболизма и прямые трофические связи между нейронами. В раннем синаптогенезе нервно-мышечных синапсов отмечен феномен фагоцитоза аксона миообластами и миотрубками. Это могло бы быть начальным сигналом (после получения трофического материала) для образования синапсов, для образования специфической постсинаптической мембраны. В зоне контакта прорастающих нервов с постсинаптическими клетками часто находят как в пре-, так и в постсинаптической области эндосомы, одетые везикулы. Это показано в ходе «созревания» синапсов в зрительной коре, коре мозжечка, спинном мозге, симпатических ганглиях. Отмечены гипертрофия аппарата Гольджи и последующее новообразование одетых везикул, сопутствующих синаптическому контакту клеток ганглия с мотонейронами.

Глия, дендриты могут фагоцитировать дегенерирующие аксоны, а нейроны — небольшие выросты глиоцитов. Микрофагоцитоз как своеобразная форма клеточного каннибализма обнаружена в синапсах типа аксон — дендрит, дендрит — дендрит, дендрит — аксон, аксон — аксон, аксон — мышца, в контактах между нейроном и глией; при этом в цитоплазме «хозяина» обнаруживаются микрошипики, спинулы (см. рис. 7, Б), сложные эндосомы с двойной мембраной, а также одетые везикулы с двойной мембраной, причем в обоих случаях между двойными мембранами находятся филаментозные мостики «бывшей» синаптической щели. В этих условиях также существует реальная возможность переноса минифрагментов мембран, макромолекул от одной клетки к другой. Обнаружено, что описанные

структуры и микрофагоцитоз особенно характерны в период синаптогенеза.

При дегенерации синапсов в ходе аноксии наблюдается фагоцитоз в системах нейрон — нейрон, нейрон — мышца, нейрон — глия, в том числе и феномен «самопоедания». Так, в последнем случае речь идет о том, что при ретроградной дегенерации на теле нейрона образуются псевдоподии, фагоцитирующие окружающие отростки клетки. При дегенерации нервов нередко наблюдается «самопоедание» такого рода, что постсинаптическая мембрана вместе с субсинаптической зоной втягивается внутрь постсинаптической клетки, иногда даже вместе с остатком дегенерирующей терминали. Далее постсинаптический нейрон постепенно атрофируется, т. е. дегенерация передается от пре- к постсинаптическому участку (транснейронная дегенерация). В любой ситуации в синапсах сохраняется в жизнеспособном состоянии постсинаптический участок, который, как правило, ближе к своему трофическому центру, чем нервное окончание — к перикариону пресинаптического нейрона. Постсинаптический участок раньше созревает в онтогенезе, дольше сохраняется при деафферентации и при патологических состояниях (денервация, аноксия) стремится за счет фагоцитоза поддержать свой гомеостаз.

В нейронах эндоцитоз наиболее эффективен в активной зоне синапсов, особенно в области постсинаптических мембран, где формируются эндосомы, в том числе и одетые везикулы. Как правило, эндосомы и одетые везикулы по размеру больше синаптических пузырьков, кроме того, первые переменны по своим размерам.

В онтогенезе при реализации генетической программы протекает квантованный микрофагоцитоз клеточных отростков, зон взаимного притяжения, взаимный обмен микрофрагментами. В этих условиях происходит клеточное узнавание, имеющее информационное и иммунологическое значение. Процессы фагоцитоза резко усиливаются при ряде патологических состояний нервной системы (острая аноксия, гиперактивность нейронов, дегенерация нервов, травма, глиомы). При аноксии дендриты фагоцитируют окружающие их нервные окончания. Астроциты, которые при аноксии набухают, становятся «жертвой» фагоцитоза дендритов.

В раннем онтогенезе в мозге, когда нейрон сохраняет в себе черты малодифференцированной клетки, когда еще не завершился синаптогенез, когда его отростки способны к интенсивному амебоидному движению, он характеризуется интенсивным фагоцитозом. В зрелом возрасте в мозге феномен «самопоедания» путем фагоцитоза замедляется. Соответственно, у более молодых животных резче выражены явления гибели нейронов. У взрослых животных синаптические структуры элиминируются не «самопоеданием», а за счет отторжения их от тела нейронов отростками глии с последующим фагоцитозом.

Специфический или рецептор- индуцируемый эндоцитоз

2

2.1. Феноменология специфического эндоцитоза

В 1964 г. был обнаружен *высокоспецифический адсорбционный эндоцитоз*, или *рецептор-индуцируемый эндоцитоз* (см. табл. 1), отличающийся от фагоцитоза и пиноцитоза. В этом случае клетки захватывают специфические крупные молекулы (лиганды) или небольшие частицы при помощи соответствующих рецепторов плазмалеммы. Связывание лиганда с рецептором вызывает микроинвагинации мембраны, которая углубляется, округляется, слипается, так что лиганд оказывается в составе специфической эндосомы, называемой *одетой везикулой* (табл. 2). Затем в клетке происходит трансформация этих везикул, что будет далее рассмотрено специально.

Впервые такой эндоцитоз был описан при изучении захвата яйцеклетками птиц и насекомых большого количества белков, которые запасаются в желтке для питания зародышей. Эти белки синтезируются в различных тканях организма и затем переносятся в развивающийся ооцит. Например, у самок комаров такой белок-предшественник *вителлогенин* синтезируется в печени, секретируется в кровь и с током крови попадает в яичники. В этих железах молекулы вителлогенина связываются с клеточными рецепторами, которые расположены в примерно 300 000 микроинвагинациях на поверхности ооцита. Постепенно образуются одетые везикулы, которые сливаются и образуют желток. Под действием протеиназ вителлогенин превращается в два важных желточных белка — *липовителлин* и *фосвитин*.

Специфический эндоцитоз у млекопитающих передает иммунитет от материнского организма к развивающемуся плоду. Антитела из крови матери связываются с клетками плода, окружающими желточный мешок. На поверхности этих клеток имеются рецепторы, чувствительные к IgG. Связавшиеся антитела затем захватываются клетками и переносятся в кровотока плода.

Таблица 2. Некоторые характеристики специфического эндоцитоза

Лиганд	Клетки	Деградация в лизосомах	Молекулярная масса рецептора: t_{90} интернализации лиганда, мин; t_{50} рецептора, ч
ЛНП	Фибробласты, гепатоциты, лимфоциты и др.	Да	ГП ¹ ; 160 кД; 5 мин; 25 ч; холестерин остается в клетке
Фактор роста	Эпителий	Возможно	ГП; 180 кД (59 и 42 кД — димер)
Транскобаламин II	Почки, гепатоциты, фибробласты	Да	ГП; 50 кД; 60 мин; 8 ч; витамин В ₁₂ остается в клетке
Трансферрин	Эритроциты, ретикулоциты, фибробласты	Возможно	ГП; 180 кД (90 кД — димер); 3 мин
Фосфитин, липовителлин	Ооциты	Нет	—
Реовирус	Фибробласты	Да	—
Вирус лихорадки Семлики	» »	»	—
Вирус стоматита	MDCK-клетки	»	—
Вирус гриппа	Многие	»	Возможно ГП
Дифтерийный вирус	Фибробласты, почки	»	—
Холерный токсин	Многие	Да (и в АГ) ¹	Ганглиозиды
Столбнячный токсин	Нервные окончания нейронов	—	»
Инсулин	Гепатоциты, адипоциты, лимфоциты, фибробласты	Да	ГП; 130—135 и 49—90 кД
Хорионный гонадотропин	Опухоль Лейдига, яичники	»	—
Пептиды хемотаксиса	Лейкоциты, нейтрофилы, макрофаги	»	Связь с цитоскелетом; 0,5—4 мин
Комплемент (C3b)	Лейкоциты	Возможно	ГП; 205 кД; трипсин чувствительные

Продолжение табл. 2

Лиганд	Клетки	Деградация в лизосомах	Молекулярная масса рецептора; τ_{50} интернализации лиганда, мин; τ_{50} рецептора, ч
Эпидермальный фактор роста IgG ₁ , IgG2b мышей	Фибробласты, гепатоциты Макрофаги, лимфоциты	Да, есть специфика Да	ГП; 150 кД; <5 мин ГП; 47—60 кД; 10 ч; трипсин- резистентные Fc-рецепторы ГП; 65 кД
IgG _{2a} мышей IgG3 мышей IgG IgG	То же » Эпителий Лейкоциты	Возможно » »	— —
IgA IgE	Лейкоциты, эпителий Базофилы, тучные клетки	Нет	ГП; трипсинчувствительные Fc- рецепторы ГП; 90 кД
β -Глюкуронидаза α -Идурунидаза	Фибробласты »	Нет (в АГ) »	ГП; 45—55 кД 2,5 мин 2,5 мин
Асиало-ГП	Гепатоциты	Да	2,2 мин; 20 ч
Галактоза-терминальный ГП Манноза-фукоза-терминаль- ный ГП	Макрофаги, эндотелий »	» »	ГП; 42—59 кД <5 мин
Манноза-6-фосфат, содержа- щий ГП	Фибробласты	»	ГП; 150 кД
Ацетилированные ЛНП	Макрофаги	»	—
α_2 -Макроглобулин-протеаза	»	»	2—4 мин; 3,3 ч
Фактор роста нерва	Адренергические нервы	—	—
β -Меланотропин	Меланома	(в АГ)	—
Пролактин	Гепатоциты, клетки Бреста	Да	—

¹ АГ — аппарат Гольджи, ГП — гликопротеин. В большинстве случаев доказано фор-
мирование одетых везикул.

Специфический эндоцитоз способствует встраиванию холестерина в плазмалемму любых клеток млекопитающих. Холестерин синтезируется в печени и запасается там в составе липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Каждая частица ЛНП содержит «ядро», состоящее примерно из 1500 молекул холестерина, связанного ковалентно с остатками жирных кислот. Это ядро покрыто однослойной фосфолипидной мембраной, в состав которой также входит холестерин, а в мембрану ЛНП погружен апо-белок (апо-*b*). Частицы ЛНП секретируются клетками печени в кровяное русло, и в форме ЛНП холестерин разносится по всему телу. Частицы ЛНП связываются со специфическими рецепторами плазмалеммы, узнающими апо-*b*, и затем попадают в клетку вышеописанными способами. После преобразования одетых везикул в гладкие везикулы последние сливаются друг с другом, а затем макровезикулы сливаются с лизосомами, где происходит разделение ЛНП до отдельных молекул. Высвободившиеся холестерин и жирные кислоты принимают участие в восстановлении плазмалеммы. Отсутствие в мембранах фибробластов рецепторов для апо-*b* является причиной *гиперхолестеринемии*, которая характеризуется очень высокой концентрацией холестерина в крови и приводит к раннему атеросклерозу у людей. Некоторые клетки при данной наследственной патологии имеют специфические рецепторы к апо-*b*, но не способны формировать одетые везикулы, что приводит к дефекту захвата ЛНП.

В фибробластах содержится гликопротеиновый рецептор плазменных ЛНП (160 кД). Один из продуктов распада ЛНП — холестерин — тормозит в клетке синтез этого рецептора, предотвращая его гиперпродукцию. Количество рецепторов ЛНП в фибробластах зависит от концентрации ЛНП в крови. Если в крови создается высокая концентрация ЛНП, то число рецепторов снижается на 90% по сравнению с нормой, когда содержание ЛНП в крови мало.

Таким образом, потребление ЛНП строго соответствует потребности клеток в холестерине. Следовательно, система снабжения клеток холестерином регулируется по принципу обратной связи — регуляцией синтеза молекул рецепторов ЛНП. Если клетки хорошо снабжаются холестерином, то экспрессия гена, кодирующего рецептор ЛНП, ослабляется. Благодаря уменьшению количества этих рецепторов клетки в меньшей степени извлекают ЛНП из крови. Общее снижение количества рецепторов (особенно в печени) приводит к увеличению содержания ЛНП в крови, а затем и к атеросклерозу.

Эта закономерность продемонстрирована при изучении *наследственной гиперхолестеринемии* — заболевания, развивающегося в результате мутации в гене рецептора ЛНП. У людей, гетерозиготных по этому гену, в клетках синтезируется половина необходимого количества полноценных рецепторов. В гомозиготных клетках (оба гена мутантные) вообще не обра-

зуются нормальные рецепторы. В первом случае у людей уровень ЛНП в плазме крови увеличен в 2 раза, а вероятность инфаркта до 60 лет у них в 25 раз выше средней. Во втором случае уровень ЛНП выше нормы более чем в 6 раз, и люди, как правило, умирают от инфаркта в возрасте до 20 лет. Эти исследования привели к химиотерапии данного заболевания: лекарственные препараты снижают синтез холестерина и тем самым включают синтез новых молекул рецепторов ЛНП.

На ранних стадиях атеросклероза в эндотелии резко активизируется неспецифический эндоцитоз ЛНП, которые попадают в крупные эндосомы и кавеолы. Процесс интернализации ЛНП увеличивается в этом случае за счет обогащения аргинином апо-белка *E*, т. е. активация эндоцитоза происходит благодаря повышению электростатического взаимодействия положительных зарядов ЛНП с отрицательно заряженной мембраной эндотелия. Длительная активация неспецифического эндоцитоза вызывает патологические изменения в клетках.

Можно привести несколько примеров специфического эндоцитоза, имеющих место при поглощении некоторых гормонов, лекарств и пр. Например, молекулы инсулина связываются со специфическими рецепторами клеток-мишеней, далее комплекс рецептора с инсулином попадает внутрь клетки и инсулин гидролизуются в лизосомах. Предполагают, что именно после образования одетых везикул прекращается специфический ответ клетки на данный «метаболический» гормон — резкое увеличение входа в клетку глюкозы. Таким же путем захватываются лекарственные вещества, как, впрочем и «вредные», — вирусы, токсины. Например, если в крови появляются аномальные гликопротеины, в которых углеводная цепочка оканчивается не сиаловой кислотой, как обычно, а галактазой, то рецепторы плазмалеммы печени «узнают» и захватывают такие гликопротеины, которые затем разрушаются в лизосомах. Специфический эндоцитоз более всего характерен для иммунокомпетентных клеток, рецепторы которых связывают антитела строго избирательно. Индуктором такого рода эндоцитоза IgG лейкоцитами или макрофагами является тетрапептид *тафцин*.

Еще один пример специфического эндоцитоза — захват ионов железа различными клетками в форме специального транспортного белка — *трансферрина*. Этот белок аккумулирует ионы Fe в кишечнике (где эти ионы освобождаются из пищи) и в печени (где железо запасается). Молекула трансферрина связывает два иона Fe. Эта молекула взаимодействует с особым рецептором плазмалеммы, и далее образовавшийся комплекс путем эндоцитоза втягивается внутрь клетки, снабжая железом те или иные клетки. Данный рецептор является, как и все практические известные рецепторы, интегративным белком, а точнее гликопротеином (180 кД), состоящим из двух одинаковых субъединиц, которые связаны между собой дисульфидным мостиком. Большая часть молекулы рецептора экспо-

нирована во внеклеточную среду (эта особенность не уникальна, она является характерной для многих рецепторов). Каждая полипептидная цепь содержит, по крайней мере, три углеводных остатка и остаток пальмитиновой кислоты, который, как якорь, удерживает рецептор в мембране. На внутренней поверхности мембран клеток в составе данного рецептора содержатся два фосфорилированных остатка, очевидно, серина. Рецептор связывает две молекулы трансферрина, скорее всего по одной молекуле в каждой полипептидной цепи. При физиологических условиях образовавшийся комплекс сразу переходит внутрь клетки. В эксперименте удается разобщить связывание трансферрина и интернализацию комплексов, поскольку для связывания лиганда с рецептором энергия не нужна, а для втягивания комплекса внутрь клетки она необходима; следовательно, второй процесс можно подавить снижением температуры или ингибиторами метаболизма. Полумаксимальное насыщение рецепторов трансферрином равно 5 нМ.

Макрофаги при помощи специфического эндоцитоза фагоцитируют клетки-мишени, связанные с Ig и компонентом, этот процесс подавляется ингибитором метаболизма 2-дезоксид-Д-глюкозой, не влияющей на неспецифический фагоцитоз. Макрофаги при помощи специфического эндоцитоза поглощают эритроциты, опсонированные IgG.

Эндоцитоз может регулировать количество антител во внеклеточной среде. Например, на поверхности В-лимфоцитов иммуноглобулины распределяются не диффузно, а в виде отдельных скоплений (пэтчей — от англ. *patching*), которые могут латерально мигрировать по мембране в латеральном направлении, концентрируясь на одном из полюсов клетки (рис. 8). Часть

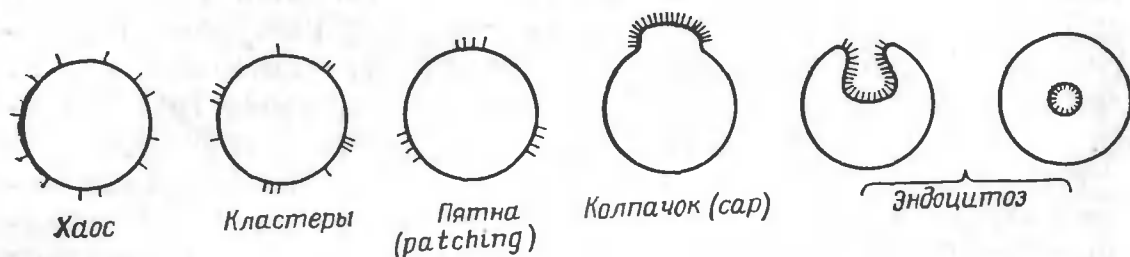


Рис. 8. Форма распределения рецепторов и антигенов в плазмалемме

пэтчей интернализируется, благодаря чему регулируется количество антител. Миграция, образование пэтчей иммуноглобулинов совместно с гликопротеиновыми рецепторами для многих клеток ингибируются цитохалазином В, индуцируется Кон А, облегчается при обработке клеток колхицином. Другими словами, латеральное движение рецепторов в плазмалемме регулируется цитоскелетом, ассоциированным с мембраной.

2.2. Интернализация рецепторов

Процесс специфического эндоцитоза включает образование комплекса лиганд — рецептор и кластеризацию комплексов при помощи латеральной диффузии и с участием цитоскелета. Кластеры располагаются в определенных участках возле окаймленных ямок (пор). Эти ямки есть почти у всех клеток животных, занимая, как правило, около 2% клеточной поверхности. Например, фибробласты на образование фонда одетых везикул за 1 мин «тратят» 2% плазмалеммы. Под каждой ямкой на внутренней поверхности плазмалеммы расположен тонкий фибриллярный слой, построенный из белка *клатрина*. При кластеризации рецепторов в зоне ямок происходит вытеснение «ненужных» белков со стороны внешней поверхности плазмалеммы. Зона окаймленных ямок — участок сортировки молекул, избирательного накопления рецепторов, а затем и комплексов лиганд-рецептор. Взаимодействие лиганда с рецептором вызывает быстрое, почти трехкратное увеличение количества ямок. Далее зона ямок с участками лигандорецепторного комплекса увеличивается до критических размеров в течение 1 мин, т. е. идет процесс инвагинации.

Затем образуются одетые везикулы, которые отрываются от мембраны и далее двигаются в цитоплазме клеток. Процесс погружения комплекса лиганд — рецептор внутрь клетки и образование одетых везикул принято называть *интернализацией*. Образование одетых везикул происходит с большой скоростью, почти непрерывно: окаймленные ямки втягиваются внутрь клеток, формируются одетые везикулы, а на клеточной мембране постепенно снова возникают новые ямки. Процесс впячивания ямок в цитоплазму, очевидно, обеспечивается механическими силами, создаваемыми клатриновым слоем и цитоскелетом. Иногда одетые везикулы формируются путем отделения от более крупных инвагинаций, не имеющих изначально окаймления.

Является ли стадия кластеризации универсальной? Видимо, нет. Все зависит от типа рецепторов. В фибробластах кластеры рецепторов ЛНП располагаются преимущественно в участках окаймленных ямок даже в отсутствие лиганда. Напротив, рецепторы трансферрина, инсулина и гликопротеинов с терминальной галактозой исходно распределены по клеточной поверхности более или менее равномерно и образуют кластеры в местах окаймленных ямок только после связывания лиганда и при температуре не ниже 37°C. Фибробласты специфически связывают ЛНП или асиалогликопротеины и образуют одетые везикулы даже при 4°C или после обработки клеток формальдегидом.

Фагоцитоз и жидкофазный пиноцитоз могут также инициироваться областью плазмалеммы, покрытой изнутри клатриновой решеткой. Так, показано, что некоторые фагосомы макрофагов, захвативших латекс, частично покрыты клатриновой «шубой». В этом случае полипептидный состав мембран таких фагосом и плазмалеммы практически сходен. Некоторые вирусы связыва-

ются клетками при помощи микроворсинок, затем при помощи латеральной диффузии вирус переносится в ту область плазмалеммы, где изнутри имеется клатриновая «шуба» и только после этого образуются одетые везикулы, содержащие вирус. Часть вирусов может захватываться жидкофазным пиноцитозом, но при частичном участии окаймленных ямок, содержащих клатриновую «шубу».

Очевидно, структура некоторых рецепторов «запрограммирована» на миграцию вдоль поверхности мембраны и их кластеризацию, т. е. на миграцию к окаймленным ямкам и дальнейшую фиксацию в этой области. По-видимому, существует высокое сродство какого-то участка рецептора к компоненту области окаймленной ямки, т. е. сродство «внутреннего» участка рецептора, выступающего в цитоплазму клетки. У других рецепторов это сродство появляется лишь при взаимодействии с лигандом благодаря изменению конформации в молекуле рецептора.

Механизм специфического эндоцитоза во многом остается неясным. Так, например, непонятно, почему одетые везикулы быстро превращаются в гладкие обыкновенные везикулы — *рецептосомы*, ведь природа не терпит убыточной экономики.

Недавно предложена следующая альтернативная схема последовательности событий. Покрытые клатрином окаймленные ямки являются стабильными элементами; они постоянно связаны с плазмалеммой и лишь претерпевают морфологические изменения в ходе эндоцитоза. После связывания и кластеризации лигандов в открытых ямках (инвагинациях, «ловушках») начинается температурно- и энергозависимый процесс закрытия горловины «одетых» ямок. Предполагают, что слияние мембран в области горловины не происходит. На этой стадии «одетые» ямки функционально изолированы.

Далее довольно необычным способом образуется рецептосома. При закрытой горловине активный транспорт ионов может вызвать повышение гидростатического давления внутри «скрытых» одетых везикул, что заставляет горловину удлиняться. Образованная таким образом в районе горловины область «одетых» ямок, не покрытая клатрином, замыкает в себе перешедшие в нее комплексы лиганд — рецептор, образуя тем самым рецептосому. Затем рецептосома отрывается от «одетых» ямок и направляется к аппарату Гольджи. Оставшаяся на клеточной мембране «одетая» ямка открывается и готова для повторного использования. Пока трудно комментировать эту довольно противоречивую схему, однако главное, что привлекает к ней внимание, — высокая степень рециклизации «окантованности» плазмалеммы.

Специфический эндоцитоз, инициируемый добавлением лигандов, индуцирует жидкофазный пиноцитоз в том же участке плазмалеммы. Кластеризация лигандов и рецепторов в плазмалемме индуцирует специфический эндоцитоз. Если рецепторы В-лимфоцитов или С3b-рецепторы нейтрофилов обрабатывать монова-

лентными Fab-антителами, то эндоцитоз не происходит. Однако обработка интактными антителами или бивалентными $F(ab)_2'$ -фрагментами запускает как кластеризацию рецепторов, так и специфический эндоцитоз. В макрофагах комплекс Fab-рецептор интернализируется, а рецептор рециклизируется; комплекс $F(ab)_2'$ -рецептор не рециклизируется после внутриклеточной аккумуляции.

Клатриновая «шуба» располагается в плазмалемме не случайно, однако механизм узнавания мембранами клатрина неизвестен. Неясно, что является триггером формирования клатриновой «шубы» и интернализации. Известны мутанты фибробластов с дефектом интернализации, которые связывают ЛНП в «неодетой» области плазмалеммы, однако интернализация происходит с низкой скоростью. Клетки карциномы А-431 человека имеют большое число рецепторов для ЛНП, но в плазмалемме зоны рецепторов мембраны изнутри не покрыты клатриновой «шубой», поэтому интернализация протекает довольно медленно. В некоторых случаях связавшиеся с мембраной вирусы далее мигрируют по мембране к «окантованному» участку и только после этого интернализируются.

2.3. Свойства одетых везикул. Клатрин

Одетые (окаймленные, окантованные) везикулы и их основной белковый компонент — *клатрин* впервые выделены (1975) сначала из мозга, а потом из других тканей. Они содержат на внешней поверхности клатриновую «шубу», которая представляет собой корзинчатые структуры ($d \approx 1,2$ нм) с пента- и гексагональными ячейками (ширина 6,5 нм, длина 16,5 нм), образованные в результате полимеризации клатрина. Эти органеллы переменны по своим размерам ($d \approx 50—250$ нм) даже в одной и той же клетке. Одетая везикула диаметром 200 нм содержит около сотни молекул клатрина. Клатриновая сеть, как правило, состоит из 12 пента- и 4 (или 8) гексагонов. Клатриновая решетка локально разупорядочивает липидный бислой мембран одетых везикул. Помимо основного филаментозного кислого белка клатрина (180 кД) в составе одетых везикул определяется несколько минорных белков — 32 и 36 кД (легкие цепи клатрина), 55 и 100—150 кД. Клатриновую сеть и сам клатрин можно отделить от мембран одетых везикул, при этом образуются похожие на трилистник структуры — *трискелионы*. При определенных условиях наблюдается агрегация трискелионов в своего рода корзинчатые структуры, которыми окружены одетые везикулы.

Трискелион (630 кД; 8,4S) состоит из трех молекул клатрина и трех молекул низкомолекулярного минорного белка. Предполагают, что эти минорные белки крепят полигональную вершину тримера клатрина в составе трискелионов. С мембранами одетых везикул клатрин связывают высокомолекулярные минорные белки (50 и (или) 100—150 кД). Считают, что сборка клатрина в

решетчатые структуры происходит на внутренней поверхности плазмалеммы. Образование такой решетки — сигнал для образования инвагинации (окаймленной ямки) с комплексом лиганд — рецептор и формирования одетых везикул. Трискелион связывается с одетыми везикулами, из которых удалена клатриновая сеть, но не связывается с везикулами из эритроцитов; эти везикулы не способны образовывать одетые везикулы. Очевидно, на поверхности одетых везикул есть белок, ответственный за прикрепление клатриновой сети.

В опытах *in vitro* детально изучен процесс разборки одетых везикул и обратный процесс сборки клатриновой сети из клатрина и построение «каркаса» на «раздетых» гладких везикулах. Разборка одетых везикул протекает при $pH \geq 8,0$, при этом ионы Mg (10 мМ) стабилизируют одетые везикулы от разборки и ускоряют сборку. Для сборки нативных одетых везикул необходимы как клатрин, так и минорные компоненты. Ионы Mg незаменимы на Ca^{+2} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Если одетые везикулы обработать 2М мочевиной, то разборка приводит к появлению в среде инкубации гладких везикул, клатриновой сети (полимеры клатрина) и легких цепей клатрина. Если же далее среду довести до pH 8,3, то образуются трискелионы, которые при pH 6,5 преобразуются в корзинчатые структуры диаметром 80 нм, похожие на нативные одетые везикулы.

Итак, разборка одетых везикул протекает при щелочных значениях pH , сборка же происходит при $pH \leq 7,0$; последний процесс тормозится ацидотропными веществами. В мембранах одетых везикул локализована протонная АТФаза немитохондриального типа, т. е. гидролиз АТФ протекает на внешней поверхности везикул, при этом происходит подкисление матрикса везикул.

В среде с высокой ионной силой (0,5—0,6 М KI ; $\geq 0,25M$ $MgCl_2$) из одетых везикул экстрагируется клатрин. Последующий диализ этой суспензии против буфера с низкой ионной силой приводит к сборке корзинчатых структур, не идентичных полностью одетым везикулам; для нормальной сборки необходимы минорные белки. Очищенный клатрин в этих условиях не полимеризуется. Клатрин (8,2S) при $pH \leq 7,0$ в присутствии K^+ и Mg^{2+} образует решетчатые структуры; в отсутствие Mg^{2+} — агрегаты диаметром 16 нм, а при pH 7,5 в отсутствие солей образует прозрачные растворы, содержащие линейные волокна; в присутствии 0,2 М CH_3COONa образует крупные полимеры с K_s 150 и 300S. Ограниченный протеолиз способствует разборке одетых везикул и появлению в среде инкубации клатриновой сети без легких цепей.

В 1984 г. в цитозоле клеток была обнаружена особая «раздевающая» АТФаза, которая, связываясь с легкими цепями клатрина, осуществляет разборку одетых везикул. Важное условие — легкие цепи при этом обязательно должны быть ассоциированы со связанными в сеть трискелионами; свободные трискелионы или свободные легкие цепи не активируют эту АТФазу. Указан-

ная АТФаза выполняет функцию переносчика клатрина в цитоплазме.

Липидный состав одетых везикул изучен слабо. Во фракции одетых везикул мозга соотношение холестерина/фосфолипиды равно 0,1—0,3 (для сравнения: плазмалемма — 0,3—1,2, митохондрии — 0,03—0,09, ЭПР — 0,03—0,08).

Большинство исследователей предполагают, что мембраны окаймленных ямок содержат довольно мало холестерина, который, как известно, регулирует жидкостные свойства мембран (чем больше содержание холестерина, тем больше ригидность мембран). Снижение жидкостных свойств мембран в зоне окаймленных ямок может способствовать инвагинации ямок и их отделению от мембран, т. е. образованию одетых везикул.

Биологический смысл формирования одетых везикул остается неясным. Может быть, клатриновая «шуба» необходима как форма самосохранения одетых везикул (и их содержимого) от лизиса, а возможно, что «шуба» необходима для сцепления этих органелл с цитоскелетом и последующего их транспорта в клетке.

2.4. Трансформация одетых везикул.

Рециклизация рецепторов

В последние годы выяснены пути трансформации одетых везикул в ходе специфического эндоцитоза (рис. 9). По мере того как одетые везикулы проникают в глубь цитоплазмы, они быстро (в течение нескольких секунд) теряют клатриновую оболочку и сливаются друг с другом или с везикулами иного типа (например, возникающими после жидкофазного пиноцитоза), так что образуются более крупные пузырьки с гладкой поверхностью, т. е. *эндосомы* (их иногда называют гладкими везикулами или *рецептосомами*). Этот процесс протекает быстро, в течение нескольких секунд — минут. Содержание рецепторов (и лигандов) в рецептосомах в 2—4 раза (по другим данным, в 4—10 раз) больше, чем в плазмалемме. При низкой температуре гепатоциты способны специфически захватывать гликопротеины, но процесс слияния эндосом с лизосомами резко тормозится. Указанный процесс слияния тормозится и при обработке макрофагов Кон А.

Априорно трудно допускать, что простое связывание лигандов с плазмалеммой обязательно приведет к захвату его клеткой, поскольку адсорбированный лиганд должен быть оккупирован сегментами мембраны с образованием инвагинации и только после этого интернализован внутрь клетки. Отмечается высокая скорость связывания лигандов с плазмалеммой и относительно низкая скорость интернализации. Интернализация тормозится при 4°C, действии ЭДТА, протеиназ, конкурентных антагонистов лигандного связывания, при низком значении рН.

Расчеты показывают, что клетки интернализируют лиганды в 5—30 раз выше, чем максимальное число адсорбированных моле-

кул, при этом число связывающих мест на мембране (т. е. активных центров молекул рецепторов) в ходе эндоцитоза остается постоянным. Следует учесть, что бо́льшая часть лигандов может связываться с рецепторами и с низким сродством. Кроме того, часть лигандов попадает в одетые везикулы «по совместительству», по типу жидкофазного пиноцитоза. Показано, что связавшие-

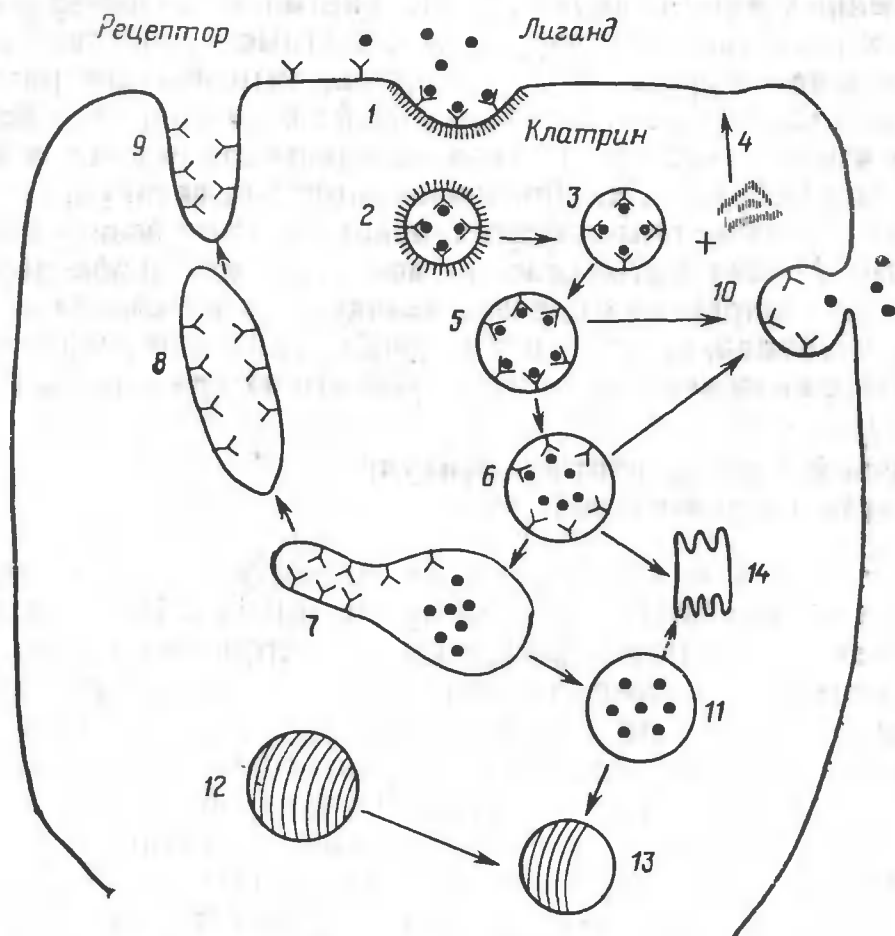


Рис. 9. Трансформация одетых везикул (ОВ), рециклизация рецепторов:

1 — одетая ямка, 2 — ОВ, 3 — гладкая везикула, 4 — рециклизация клатрина в плазмалемму, 5 — слияние гладких везикул в эндосому (рецептосому), 6 — частичная диссоциация комплекса лиганд — рецептор в рецептосоме, 7 — частица CURL, 8 — отделение тубулярной части от CURL, содержащей рецепторы, 9 — рециклизация рецепторов, 10 — слияние рецептосом (5, 6) с плазмалеммой, 11 — отделение везикулярной части с лигандами от CURL, 12 — лизосома, 13 — слияние 11 и 12 (деградация лигандов), 14 — возможная трансформация везикул 6, 11 в системе ГЭРЛ

ся лиганды сравнительно быстро интернализируются (в течение 2—5 мин; см. табл. 2). По-видимому, не существует большого фонда рецепторов, способных замещать те рецепторы, которые вместе с лигандами вовлечены в образование рецептосом. В большинстве случаев число связавшихся лигандов превышает число рецепторов, т. е. связывание — поливалентно. Лиганды и рецепторы в виде комплекса интернализируются совместно и одновременно. То же самое было показано при адсорбционном неспеци-

фическом пиноцитозе с образованием эндосом без клатриновой «шубы».

Процесс интернализации, т. е. образования одетых везикул, не ингибируется циклогексимином. В первые минуты после инициации специфического эндоцитоза часть одетых везикул и гладких эндосом может слипаться с плазмалеммой. Этот процесс рециклизации мембран рецепторами и лигандами не чувствителен к циклогексимида. Некоторые рецепторы (Fc-рецепторы макрофагов) даже в отсутствие экзогенных лигандов могут интернализироваться и попадать в эндосомы, что свидетельствует о спонтанной рециклизации рецепторов, обусловленной эндогенными лигандами.

Макрофаги при 0°C обрабатывали (30 мин) трипсином, после этого резко тормозилось (на 70%) связывание маннозил-гликопротеинов с рецепторами. Однако спустя 1 мин после инкубации клеток при 37°C лигандрецепторное связывание нормализовалось. Эти данные интерпретируют как косвенное доказательство рециклизации рецепторов в плазмалемме. На это же указывают данные о том, что сами белковые рецепторы обмениваются медленно, как и большинство белков плазмалеммы (см. табл. 2).

Все механизмы рециклизации рецепторов, как, впрочем, и рециклизация плазмалеммы, пока имеют качественную характеристику. Некоторые рецепторы при определенных условиях не рециклизируются совсем или плохо восстанавливаются в составе плазмалеммы. Например, макрофаги в качестве лиганда захватывали IgG-опсонированные эритроциты на фоне добавления моноклональных антител против Fc-рецепторов. Обнаружено, что интернализация рецепторов в ходе эндоцитоза составила 70%. Однако оставшееся количество рецепторов сохранялось на постоянно низком уровне более чем 24 ч. Этот факт расценивался так, что деградация этих рецепторов гораздо выше, чем их рециклизация. Оказалось, что τ_{50} для Fc-рецепторов в отсутствие лиганда равно 10 ч, а в присутствии лиганда около 50% рецепторов разрушалось довольно быстро ($\tau_{50} < 2$ ч). Таким образом, антигенобработанные лиганды запускают интернализацию и деградацию Fc-рецепторов.

В макрофагах 7500 молекул рецепторов для маннозиллированных белков способны эндоцитировать $2 \cdot 10^6$ молекул лигандов за 1 ч, что указывает на высокую скорость рециклизации рецепторов (в течение нескольких минут). Печень перфузировали раствором, содержащим асиалогликопротеины, при 16°C. Лиганд попадает в рецептосомы, но не в лизосомный фонд. Отмечено, что число рецепторов для лиганда в плазмалемме в этих условиях остается постоянным, что также указывало на возможность рециклизации рецепторов.

Некоторые лиганды (комплекс α_2 -макроглобулин — протеиназа, некоторые гормоны и гликопротеины) оказывают первичный эффект на клетку-мишень только на внешней поверхности мемб-

ран и последующий их захват клеткой вместе с рецепторами начинается путь устранения длительности биологического эффекта этих лигандов. Другие лиганды (ЛНП, комплекс витамина В₁₂ с транскобаламином II, полипептидные токсины, вирионы, эпидермальный фактор роста), захватываясь клеткой, далее из эндосом и других везикул высвобождаются в цитоплазму клеток и оказывают свое действие на метаболизм. Если в первом случае лиганды радикально изменяют метаболизм через внутриклеточные регуляторы (система циклических нуклеотидов, Са²⁺ и кальмодулин и др.), то во втором случае пока неясно взаимоотношение эндоцитоза и универсальных внутриклеточных регуляторов.

Один фибробласт каждые 2 ч интернализирует внутрь клетки область, эквивалентную всей клеточной поверхности. Для компенсации быстрой потери участков плазмалеммы необходима столь же быстрая рециклизация мембран. Одна часть рецепторов, попадая в клетку, разрушается в лизосомах, например рецепторы фактора роста эпидермиса, инсулина. В этом случае необходимо определенное время для ресинтеза белка и его встраивания в мембрану. Другая часть рецепторов, попадая в клетку, остается сохранной и постепенно снова возвращается в плазмалемму, например рецепторы α₂-макроглобулина — ингибитора плазматической протеиназы.

В результате сложного цикла эндоцитоза и рециклизации мембран и их компонентов (рецепторов) мембраны одетых везикул, эндосом, вакуолей и плазмалеммы не выравниваются по своему составу. Очевидно, существует специфический отбор белков плазмалеммы в ходе образования одетых везикул, тот же строгий отбор происходит и в ходе рециклизации, поэтому мембраны «не смешиваются».

Судьба проникших в клетку лигандов неодинакова, но большинство из них «проходят испытания» в лизосомах. Лизосомные гидролазы разрушают попавшие в лизосомы лиганды, а продукты их деградации удаляются из клетки либо, как в случае ЛНП, переносятся в цитоплазму и используются там в качестве строительного материала. Было бы слишком расточительным уничтожать в лизосомах и рецепторы. С помощью ингибиторов синтеза белка можно блокировать образование и синтез новых рецепторов, а рециклизация рецепторов будет продолжаться.

Время жизни большинства рецепторов намного выше времени жизни соответствующих лигандов. Каждая молекула рецептора связывает лиганд один раз в 10—15 мин и сохраняет активность в течение многих часов. Непрерывная циркуляция рецепторов свойственна тем из них, которые локализованы в окаймленных ямках постоянно (даже в отсутствие лиганда), так как указанные ямки затем втягиваются. Другие рецепторы вступают в цикл кругооборота только после связывания лиганда, поскольку только в такой форме они мигрируют в мембране к окаймленным ямкам.

Для изучения каким образом и когда рецептор освобождает

ется от лиганда был использован оригинальный метод. Были получены антитела к гликопротеину с терминальной галактозой и к соответствующему рецептору. Эти антитела поместили коллоидными частицами золота различного размера. Крысам вводили гликопротеины с терминальной галактозой и через различное время после инъекции животных декапитировали. Печень фиксировали, делали срезы и обрабатывали их антителами против лиганда и против рецептора. Благодаря частицам золота связавшиеся антитела были видны на электронных микрофотографиях как темные точки. Оказалось, что в срезах, полученных на ранних стадиях специфического эндоцитоза, и лиганды и их рецепторы находятся в тесной связи с мембранами одетых везикул, располагаясь непосредственно под клеточной поверхностью. В матриксе одетых везикул свободных лигандов не было. На этой стадии молекулы лиганда еще соединены с рецепторами, погруженными в мембрану одетых везикул. По мере удаления от поверхности клеток размер одетых везикул увеличивается и внутри образованных эндосом появляется все больше свободного лиганда, хотя основная часть по-прежнему находится в виде комплекса лиганд—рецептор на внутренней поверхности эндосом.

Эндосомы затем преобразуются в новую органеллу *CURL* (от англ. — место разделения рецептора и лиганда; см. рис. 9). В этой везикулярно-тубулярной органелле происходит диссоциация рецептора и лиганда и их перераспределение, в результате которого лиганды накапливаются в свободной форме в везикулярной части органеллы, а рецепторы — в тубулярной части. Молекулы рецептора остаются погруженными в мембрану органеллы: рецепторы либо образуют кластер на одном из полюсов везикулярной части органеллы, которым она примыкает к тонким, окруженным мембранами трубочкам (или сливается с ними), либо оказывается внутри самих трубочек. Диссоциация комплекса лиганд — рецептор в *CURL* происходит из-за низкого значения рН внутри этой органеллы.

Анализ срезов печени, полученных на более поздних этапах эндоцитоза, показал, что везикулярная часть *CURL* (эндоцитозная вакуоль) сливается с лизосомами, где происходит деградация лиганда. Прежде чем произойдет слияние, тубулярные участки, нагруженные рецепторами, отсоединяются от везикул *CURL*, так что рецепторы избегают воздействия лизосомных ферментов. Тубулярные структуры, вероятно, обеспечивают возврат рецепторов в плазмалемму. Каким образом это происходит, пока неясно; возможны два варианта: либо с помощью цитоскелетной системы, либо тубулярная система неподвижна и простирается от плазмалеммы до центра клетки подобно ЭПР.

Повторную утилизацию рецепторов можно подавить ацидотропными агентами. Значение рН внутри эндосом и *CURL* равно примерно 5,0. Опыты с очищенными рецепторами и лигандами показали, что, хотя при нейтральных значениях рН рецепторы прочно связывают лиганды, образующиеся комплексы легко

диссоциируют при рН ниже 5,5. Из этих модельных опытов стало ясно, что как только комплекс рецептора с лигандом попадает в кислую среду внутри эндосом или *CURL*, лиганд отделяется от рецептора и растворяется в содержимом везикул, а рецептор остается связанным с мембраной везикул и впоследствии реутилизируется. В мембранах эндосом существует Н-насос, который регулирует механизм закисления внутренней среды органеллы.

Многие рецепторы, как в составе мембран, так и изолированные, не связывают «свои» лиганды при рН 5,0 (исключение составляет Fc-рецептор мембран эпителия, связывающий IgG). Рецептосомы с флуоресцеинмеченным α_2 -макроглобулином быстро закисляются спустя 20 мин после начала эндоцитоза. При слиянии эндоцитозной вакуоли с первичными лизосомами наблюдается в случае захвата **ферротрансферрина** появление свободного Fe^{3+} , а из ЛНП высвобождается холестерин. Эти вещества затем переносятся через мембрану вторичной лизосомы в цитоплазму и поступают в определенные компартменты клеток.

В отличие от других лигандов ферротрансферрин, попав внутрь клетки, не разрушается и не запасается. Он освобождается от связанных с ним ионов Fe и быстро секретируется наружу клетки в форме не содержащего железа апотрансферрина. Аналогичный процесс характерен и для витамин B_{12} -связывающего белка. В данном случае ферротрансферрин благодаря кислой среде в *CURL* диссоциирует на свободное железо и **апотрансферрин**, который остается связанным со своими рецепторами даже при рН 5,0, чем резко отличается от других лигандов. У лишенного железа апотрансферрина сродство к рецептору при рН 5,0 такое же, как у ферротрансферрина при рН 7,0, а при нейтральном рН апотрансферрин практически не связывается с рецептором. Если комплекс апотрансферрина с рецептором быстро перенести из кислой среды в нейтральную, то он в течение нескольких секунд диссоциирует.

Свободные ионы Fe переносятся на молекулы ферритина, который в цитоплазме играет роль депо железа. Апотрансферрин, отделившись на внешней поверхности плазмалеммы от рецептора при физиологическом значении рН, увлекается током крови, готовый опять связать Fe^{3+} , а рецепторы вновь участвуют в эндоцитозе.

Опухолевые клетки печени содержат 150 000 участков связывания трансферрина на 1 клетку, они способны захватывать трансферрин в течение нескольких часов со скоростью 19 000 ионов Fe/мин; около 16 мин проходит от момента связывания лиганда с рецептором до секреции апотрансферрина, в среднем рецептор находится на поверхности клетки 4 мин и за это время он успевает связать две молекулы ферротрансферрина. Переход образовавшегося комплекса внутрь клетки занимает около 5 мин. За оставшиеся 7 мин происходит высвобождение Fe^{3+} из ферротрансферрина и возвращение комплекса рецептора с

апотрансферрином на поверхность клетки; диссоциация этого комплекса и отделение апотрансферрина протекает за 16 с.

Рецептосомы переносят некоторые гормоны в ядро клеток и таким образом иницируют процесс транскрипции. В этом процессе принимают участие и лизосомы, которые могут при некоторых обстоятельствах секретировать лизосомные ферменты в ядро. Описана возможность слияния одетых везикул с мультивезикулярными тельцами (при этом образовавшиеся крупные вакуоли секретируют содержимое в цитоплазму), а также вовлечение рецептосом в трансформацию в системе ГЭРЛ.

Интересна трансформация вируса лихорадки Семлики, состоящего из нуклеокапсиды, которая окружена мембраной, содержащей гликопротеин. Гладкая везикула, образованная из одетых везикул, сливается с лизосомой, где при рН 5,0 происходит высвобождение вируса в матрикс лизосом, после чего мембрана вируса сливается с внутренней мембраной лизосом и путем экзоцитоза в цитоплазму клетки секретирется свободный нуклеокапсид. Данную вирусную инфекцию предотвращают ацидотропные вещества. Они тормозят диссоциацию комплекса лиганд — рецептор, рециклизацию рецепторов, блокируют патогенное действие токсинов (дифтерийного и столбнячного), репликацию реовирусов. Рециклизация рецепторов не тормозится на фоне действия циклогексимида, блокирующего синтез новых молекул рецепторов, на фоне снижения температуры до 4°C, при обработке клеток глутаральдегидом.

2.5. Особые функции одетых везикул

Одетые везикулы, образующиеся из плазмалеммы в ходе специфического эндоцитоза, транспортируют от периферии к центру клетки лиганды, рецепторы и мембранный материал. В цистернах ЭПР и аппарата Гольджи также формируются одетые везикулы ($d < 0,1$ мкм), которые могут иметь отношение либо к образованию первичных лизосом, либо к внутриклеточному транспорту макромолекул. Показано, что одетые везикулы печени и мозга транспортируют вновь синтезированные лизосомные ферменты в форме высокомолекулярных «пробелков» в первичные лизосомы. Иммунохимически выявлена локализация клатрина в плазмалемме, одетых везикулах и системе ГЭРЛ. Отсюда следует, что выделяемая фракция одетых везикул из различных тканей представляет собой популяцию одетых везикул различного происхождения.

Внутриклеточные одетые везикулы отличаются от плазмалеммальных наличием щелочной фосфатазы, кислых гидролаз, тиаминпирофосфатазы, гликопротеинов; они транспортируют вещества от центра к периферии. Эти одетые везикулы поставляют материал для обновления клеточных мембран, для встраивания в них специфических компонентов, в частности гликопротеинов. В нейронах такие одетые везикулы мигрируют с быстрым аксо-

током (хотя сам клатрин как растворимая молекула движется совместно с элементами цитоскелета с медленным аксотоком) из тела клетки до конуса роста нервов, т. е. поставляют пластический материал для прорастания нерва в ходе постнатального развития или при регенерации. В некоторых клетках, пораженных инфекцией, одетые везикулы транспортируют вновь синтезированные «вирусные» белки от ЭПР к аппарату Гольджи и далее к плазмалемме. Очевидно, приближаясь к плазмалемме, данные одетые везикулы «раздеваются», а образовавшиеся гладкие везикулы слипаются с плазмалеммой, вливая «свое» содержимое в состав плазмалеммы.

Индивидуальные компоненты встраиваются в мембраны независимо друг от друга. Селективным переносом с помощью одетых везикул различных типов можно объяснить: каким образом поддерживается индивидуальность многих мембранных компартментов, несмотря на непрерывный обмен материалом между ними. В течение цикла эндоцитоза топология и асимметрия мембран всегда сохраняются.

В некоторых железистых клетках (поджелудочная, молочная и околоушная железы) одетые везикулы, образованные в аппарате Гольджи, вовлекаются далее в процесс экзоцитоза гормонов. Предполагают участие одетых везикул в секреции растворимых липопротеинов в гепатоцитах. Одетые везикулы способны также участвовать в трансэпителиальном транспорте иммуноглобулинов. Так, обнаружена ассоциация казеинсодержащих одетых везикул с микротрубочками в системе молочные железы — эпителий. Для обеспечения внутриклеточного транспорта одетых везикул служат белки цитоскелета, способные ассоциироваться с одетыми везикулами. В составе одетых везикул мозга и печени выявлены минорные компоненты: α - и β -тубулин (54—56 кД), а также τ -белок микротрубочек (50 кД), который способен фосфорилироваться эндогенной цАМФ-зависимой протеинкиназой. Считают, что эти белки связывают трискелион с мембраной одетых везикул. Сам клатрин и одетые везикулы связываются с «ручками» микротрубочек — периодическими ответвлениями от продольной оси, содержащими динеиновую АТФазу. Клатрин также способен связываться с фибриллярным актином — Φ -актином и α -актинином. Таким образом, одетые везикулы совершают челночные рейсы от центра клетки к периферии и обратно, осуществляя как «контейнеровозы» внутриклеточный транспорт макромолекул.

Как следует из рис. 8, рецепторы или антигены на клеточной поверхности располагаются хаотически (более или менее равномерно), в форме *кластеров* (агрегатов), в форме так называемых *пятчей*, или *пятен* (более упорядоченная форма кластеров), и нередко (чаще всего при патологии) в форме *колпачков* (принудительная концентрация в определенной зоне). В клетках, образующих синапсы, рецепторы концентрируются в зоне контакта. Отмечено, что колпачки рецепторов или антигенов собираются

над тем полюсом клетки, в котором находятся центриоли, вакуоли и аппарат Гольджи. Предполагают, что зоны, не содержащие антигенов или рецепторов, могут возникать благодаря постоянной рециклизации рецепторов и обновлению мембран, причем взаимосвязанные молекулы антигенов (или рецепторов) остаются на месте и объединяются в колпачок. Далее комплекс антигенов — антиген или лиганд — рецептор самофагоцитируется, клеточная поверхность освобождается от антител и лигандов, как и от избытка антигенов и рецепторов, и наступает обратный процесс — рециклизация.

2.6. Феномен увеличения эндоцитоза после экзоцитоза

Феномен значительного усиления эндоцитоза (всех типов и, в частности, специфического эндоцитоза) после экзоцитоза привлек общее внимание исследователей, начиная с 70-х годов. Он был описан для железистых клеток и нейронов, в последнем случае для синаптических структур. Данный феномен — убедительный пример *взаимосвязи эндо- и экзоцитоза*.

При интенсивной стимуляции изолированных нервов, а также при деполяризации мембран клеток срезов или синапсом мозга помимо морфологической картины экзоцитоза, Са-зависимой секреции медиаторов наблюдается значительное снижение количества синаптических пузырьков и их диаметра; увеличение объема (набухание) терминали; увеличение поверхности аксолеммы и пресинаптических мембран, т. е. увеличение площади мембран, их набухание; резкое усиление спустя некоторый период (несколько минут) после экзоцитоза микропиноцитоза и специфического эндоцитоза во внесинаптических участках нервного окончания, новообразование одетых везикул, вакуолей, цистерн, мультивезикулярных телец в синаптоплазме. Увеличение пиноцитоза и специфического эндоцитоза в синапсах происходит чаще всего в районе, примыкающем к клеткам глии, инкапсулирующим нервное окончание. Общая закономерность — снижение количества секреторных гранул в ходе экзоцитоза, более или менее эквивалентное увеличение количества одетых везикул в ходе последующего *компенсаторного эндоцитоза*. Компенсаторный эндоцитоз включает в себя образование одетых везикул и эндосом из мембранного материала «бывших» секреторных гранул, растворившихся везикул в плазмалемме (хотя и полного смещения мембран не происходит).

Увеличение эндоцитоза после периода синаптической активности наблюдается и в постсинаптической клетке. Нередко происходит внедрение пресинаптической части в постсинаптическую мембрану и наоборот (см. рис. 7, Б). Предполагают, что отмеченное явление играет важную роль в *синаптогенезе*. Эндоцитоз в нервной системе наблюдается главным образом между кон-

тактирующими нейронами, он обеспечивает взаимное проникновение мембранного материала и цитоплазмы нейронов. Обнаружено, что в аксо-дендритных синапсах нервные окончания аксона даже в норме фагоцитируют фрагменты мембран и цитоплазму постсинаптического дендрита, при этом поверхность синаптического контакта увеличивается (*феномен образования спинул*). Таким образом, в синапсах происходит не только секреция медиаторов, но и взаимный обмен информационными макромолекулами.

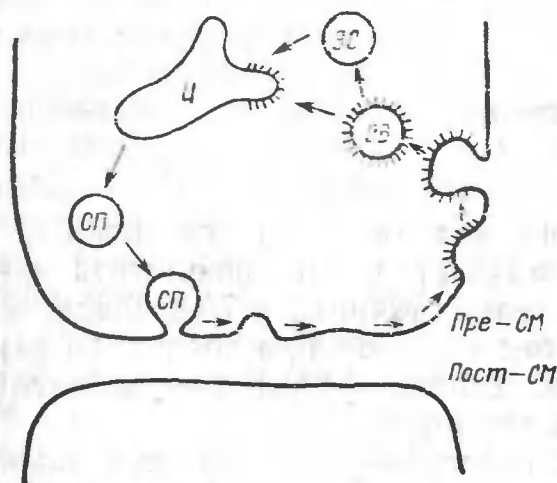


Рис. 10. Рециклизация синаптических пузырьков (феномен усиления эндоцитоза после экзоцитоза):

ЭС — эндосома (гладкая везикула); Ц — цистерны, вакуоли, Пре- и Пост-СМ — Пре- и постсинаптические мембраны

Формирование постсинаптической мембраны в зоне синапсов может быть обусловлено трансцитозом в постсинаптической клетке в ходе «пробной» секреции медиаторов «зарождающихся» синапсов. Одетые везикулы и вакуоли из системы ГЭРЛ поступают из центра на периферию в область «будущего» контакта, поставляя туда необходимый материал. Недаром при синаптической активности в области постсинаптических мембран наблюдается множество вакуолей и цитоскелетных структур, а в клетке — пролиферация аппарата Гольджи.

Усиление эндоцитоза после экзоцитоза, с одной стороны, компенсаторная, пластическая реакция клетки в ответ на повышенную функциональную нагрузку, с другой — это путь рециклизации мембран и секреторных гранул, которые далее могут формироваться из одетых везикул, гладких везикул и цистерн в синаптоплазме (рис. 10). Иммунологически показано, что клатрин отсутствует в мембранах синаптических пузырьков и в постсинаптических мембранах. Важно подчеркнуть, что описанный феномен преходящ: все вышеперечисленные показатели нормализуются, часть новообразованных структур постепенно исчезает, часть мембран плазмалеммы (в том числе и избыточная) возвращается в цитоплазму, но не в районе экзоцитоза, а в другом участке плазмалеммы. Эффект длится от нескольких минут до 1 ч.

Если ввести меченую пероксидазу в область нервно-мышечных синапсов, то постепенно метка накапливается в терминалях, а при синаптической активности пиноцитоз пероксидазы усиливается. Метка далее постепенно «перекочевывает» из одетых везикул в крупные эндосомы ($d \approx 60-90$ нм), вакуоли ($d \approx 250$ нм) и синаптические пузырьки. Отмечено, что часть пероксидазы, попавшей в синаптические пузырьки вследствие их рециклизации.

в ходе дальнейшей синаптической активности секретируется Са-зависимым образом в синаптическую щель как спутник медиатора, пусть и «случайный». Например, синаптосомы «загружают» пероксидазой при калиевой деполяризации мембран нервных окончаний. После отмывки и смены раствора повторная К-деполяризация мембран синаптосом приводит к секреции пероксидазы в среду инкубации.

Показано, что в условиях чрезмерной секреции ацетилхолина из нервно-мышечных синапсов в присутствии латротоксина и пероксидазы последняя постепенно накапливалась в холинергических синаптических пузырьках, которые содержали сниженное количество медиатора. Более того, длительная (до 30 мин) электростимуляция адренергических нервов приводит к резкому (до 60%) снижению мелких гранулярных синаптических пузырьков, в то время как содержание крупных гранулярных синаптических пузырьков, концентрирующих также катехоламины, но далеко отстоящих от района экзоцитоза, не изменяется. Через 2 ч уровень мелких синаптических пузырьков нормализуется. Если пероксидаза присутствовала в среде инкубации во время стимуляции, то большое число мелких гранулярных синаптических пузырьков содержало маркер после восстановительного периода. Отмечен также диффузный транспорт экзогенной пероксидазы в составе везикул при помощи обратного аксотока к аппарату Гольджи. Итак, часть материала, захваченного нервными окончаниями в ходе синаптической активности, поступает в тело клетки, где происходит его трансформация.

Описанный феномен усиления эндоцитоза после экзоцитоза, сопровождающийся ярко выраженной рециклизацией мембран и секреторных гранул после увеличения поверхности плазмалеммы, в большей степени проявляется в нейронах и надпочечниках, т. е. здесь наблюдается последовательность процессов — экзоцитоз предшествует эндоцитозу и рециклизации. В некоторых железистых клетках (тучные клетки, околоушная и слезная железы) процессы экзоцитоза и рециклизации протекают достаточно синхронно и коррелируют друг с другом по скорости, в других клетках (поджелудочная железа, гипофиз) процессы экзоцитоза протекают гораздо выраженнее, чем рециклизация мембран на фоне небольшого увеличения площади плазмалеммы в ходе экзоцитоза.

Рециклизация секреторных гранул может протекать тремя способами. *Первый способ* — быстрое формирование секреторных гранул в последовательности: одетые везикулы —→ эндосомы —→ цистерны —→ синаптические пузырьки (см. рис. 10). Этот путь, очевидно, осуществляется в синаптоплазме нейронов. Мембраны секреторных гранул в ходе экзоцитоза встраиваются в плазмалемму и затем используются в ходе рециклизации как плазмалеммы, так и самих секреторных гранул. Образующиеся цистерны в синаптоплазме весьма напоминают частицы *CURL* (см. разд. 2.4). Через 1—2 ч популяция синаптических пузырьков

восстанавливается, а мембранные цистерны, эндосомы исчезают, количество одетых везикул снижается до минимума.

Часть исследователей подвергают сомнению этот путь новообразования синаптических пузырьков в синапсах. Действительно, если после охлаждения до 4°C сетчатку глаза черепах снова нагревать до 22°C , то спустя 30—45 мин в синапсах отмечается накопление новых органелл — одетых везикул, вакуолей и цистерн, а спустя 60—90 мин эти органеллы исчезают и структура синапсов нормализуется. Если опыты проводить на фоне преинкубации с пероксидазой, то спустя 30—45 мин после сеанса охлаждения — нагревание сетчатки маркер содержался в вакуолях и цистернах, но не в синаптических пузырьках, а спустя 2 ч после исчезновения новообразованных органелл маркер обнаруживался в синаптических пузырьках.

Иногда рециклизация синаптических пузырьков ($d \approx 40$ —60 нм), проходя через стадию формирования одетых везикул ($d \approx 70$ нм) и эндосом ($d \approx 100$ —150 нм), лучше всего проявляется после того, как срезы мозга переносят из калиевой среды деполяризации в обычную среду. При деполяризации нервно-мышечного синапса лягушек секреция ацетилхолина сопровождается утолщением пресинаптической мембраны; через 20 мин — новообразование лабильных короткоживущих одетых везикул, вакуолей и цистерн; через 60 мин — ультраструктура синапсов нормализуется.

Очень важно, что наблюдаемый процесс рециклизации синаптических пузырьков происходит и в децентрализованных терминалях, т. е. в условиях прекращения доставки в нервные окончания из тела нейронов новых синаптических пузырьков. При электростимуляции холинергических нервов электрического органа ската в терминалях появляются плотные синаптические пузырьки, у которых диаметр на 20—30% меньше, чем у обычных синаптических пузырьков в состоянии покоя. Плотные синаптические пузырьки при стимуляции захватывают частицы декстрана, добавленного в перфузат, что указывает на участие этих синаптических пузырьков в одном и более циклах экзо- и эндоцитоза. Эти новообразованные синаптические пузырьки метаболически активны и захватывают преимущественно вновь синтезированный медиатор — ацетилхолин.

В нервно-мышечных синапсах при умеренной пресинаптической стимуляции (2 Гц, 4 ч) описан быстрый вариант рециклизации, при котором образуется очень мало одетых везикул. В этом случае сразу после слипания синаптических пузырьков с плазмалеммой без смещения мембран происходит последующее их разделение. Экзоцитоз уравнивается протекающим эндоцитозом без стадии новообразования одетых везикул рядом с районом экзоцитоза, в таком случае в ходе пресинаптической стимуляции не отмечается снижения количества синаптических пузырьков в терминалях и увеличения площади плазмалеммы.

Второй способ рециклизации — сравнительно быстрое форми-

рование новых секреторных гранул без трансформации в лизосомах. В этом случае усиленный эндоцитоз после экзоцитоза сопровождается образованием одетых везикул, эндосом, которые поступают в аппарат Гольджи, где они сливаются с мембранами и далее секреторные гранулы образуются здесь (см. рис. 3) и мигрируют к периферии — к району экзоцитоза. Такой способ описан для гранул поджелудочной и околоушной желез.

Наконец *третий способ* — медленное формирование секреторных гранул в системе ГЭРЛ, т. е. при участии лизосомной трансформации. В этом случае образовавшиеся эндосомы в ходе усиленного эндоцитоза после экзоцитоза поступают в лизосомы, сливаются с их мембранами, далее вторичные лизосомы и аппарат Гольджи участвуют в «новом» формировании популяции секреторных гранул. Эти способы хорошо демонстрируются в опытах с использованием специфических меток (пероксидаза, ферритин и др.). Второй и третий способы характерны и для нейронов.

Описанный в этом разделе феномен обнаружен и в тех секреторных клетках, которые путем экзоцитоза секретируют вещества постоянно. Это клетки, секретирующие коллаген и гликопротеины, макрофаги, секретирующие лизосомные ферменты, и клетки миеломы, секретирующие иммуноглобулины. В этом случае ускоренный пиноцитоз используется для доставки мембранного материала в аппарат Гольджи, где затем вновь формируются секреторные гранулы.

Факторы, стимулирующие *компенсаторный эндоцитоз после экзоцитоза*, пока неизвестны. Участки плазмалеммы, где происходит экзоцитоз и эндоцитоз, пространственно разобщены. Главное — повышенный уровень экзоцитоза, выражающийся в полном слиянии секреторных гранул с плазмалеммой и увеличении поверхности клеточной мембраны, спустя некоторое время индуцирует удаление избыточного мембранного материала путем эндоцитоза для постепенного восстановления плазмалеммы.

Процесс рециклизации синаптических пузырьков, видимо, зависит от ионов Са. *α-Латротоксин* (см. разд. 3,5) в безкальциевой среде вызывает в нервно-мышечном препарате лягушек в течение 45—60 мин массивный, асинхронный выброс ацетилхолина, при этом количество синаптических пузырьков снижается, терминали становятся набухшими, что указывает на отсутствие рециклизации синаптических пузырьков. В среде, содержащей ионы Са, *α-латротоксин* приводит к еще большему выбросу медиатора, чем в безкальциевой среде. Морфологические изменения в терминалях при этом отсутствуют, что указывает на сбалансированность экзо- и эндоцитоза, рециклизации синаптических пузырьков. В этих условиях добавление пероксидазы приводило к появлению этой метки в синаптических пузырьках.

Экзоцитоз

3.1. Типы секреции веществ

Каждая клетка потенциально является или гормональной, или секреторной. Клетки секретируют вещества главным образом путем *экзоцитоза*, т. е. путем слияния и слияния с плазмалеммой везикул (гранул), содержащих секретируемые вещества в высокой концентрации. В результате везикулы сливаются с плазмалеммой, а во внеклеточную среду секретируются вещества (табл. 3).

Экзоцитоз содержимого без выброса самих секреторных гранул можно представить как *обратный эндоцитоз*. Клетки освобождаются от ненужных, токсических, непереваривающихся продуктов либо высвобождают вещества, необходимые сообществу клеток, различным клеткам-мишеням. Именно в последнем случае клетки называют *секреторными*.

Клетки могут секретировать вещества путем экзоцитоза, при этом секретируется только содержимое секреторных гранул. Это *мерокриновый* (основной) тип секреции, при этом клетка теряет небольшую часть своего общего содержимого. Редкий вариант такого рода секреции — секреция веществ вместе с гранулами, при этом секретируется сложная гранула с двойной мембраной (например, секреция карбоангидразы пищеварительными железами или секреция токсических, непереваривающихся веществ разными клетками). Опухолевые клетки способны секретировать во внеклеточную среду гибнущие лимфоидные *нуклеосомы*.

Некоторые клетки секретируют содержимое части безъядерной цитоплазмы, при этом фрагмент цитоплазмы, окруженный плазмалеммой, дезинтегрируется в межклеточной среде, а продукты распада затем используются сообществом соседних клеток. Такая *апокриновая* секреция характерна для гепатоцитов, секретирующих липиды; для молочных желез, секретирующих жировые капли; для фибробластов, секретирующих коллагеновые волокна; для клеток, секретирующих нуклеокапсулы из

Таблица 3. Экзоцитоз различных веществ

Объект	Секретируемые вещества из секреторных гранул	Внешний стимул секреции
Синапсы	Нейромедиаторы (ацетилхолин, биогенные амины, медиаторные аминокислоты, нейропептиды и др.)	Нервный импульс
Околоушная слюнная железа	α -Амилаза и Ca^{2+} , РНКаза, ДНКаза, пероксидаза	Нервный импульс, норадреналин (α_2 -АР, β -АР) ¹ , ацетилхолин (М-ХР), полипептид Р
Кора почек	Ренин	Гипотония
Ацинарные клетки поджелудочной железы	Проферменты: трипсиноген, химотрипсиноген, прокарбоксипептидазы А и В, проэластаза, зимоген фосфолипазы А; ферменты: липаза, РНК-аза, ДНКаза, амилаза, ингибитор трипсина	Панкреозимин, нервный импульс
Бокаловидные клетки слизистой кишечника	Слизь, муцины (гликопротеины)	Непрерывно
Передняя доля гипофиза	Рилизинг-факторы	Гормоны гипоталамуса
Островки Лангерганса (поджелудочная железа):		
β -клетки	Инсулин, Zn^{2+}	Высокая концентрация глюкозы в плазме
α -клетки	Глюкагон	Низкая концентрация глюкозы в плазме
Плазматические клетки	Иммуноглобулины (антитела)	Непрерывно
Тучные клетки	Гистамин с гепарином, белками, Zn^{2+}	Специфические антигены
Делящиеся клетки	Пектиновые вещества, гемицеллюлоза	Индукторы деления
Желудочно - кишечный тракт	HCl	Гастрин

¹ АР — адренорецепторы, ХР — холинорецепторы.

цитоплазмы после вирусной инфекции; так происходит отрыв длинных псевдоподий от некоторых клеток. Наконец, встречается третий тип секреции — *голокриновый*. В этом случае вся совокупность необратимо дегенерирующей клетки превращается в секрет и выводится наружу (например, эпидермис, сальные железы, слизь, сетчатая зона надпочечников). При такой секреции плазмалемма гиперполяризуется.

Пути выведения различных веществ даже в одной и той же клетке разнообразны. Молочные железы секретируют казенн,

фосфорилируемый в аппарате Гольджи, путем экзоцитоза; а жировые капли, содержащие триацилглицерин, при контакте с плазмалеммой обволакиваются ею и отрываются во внешнюю среду. Пока неизвестно, как секретируются лактоза (синтезируемая в аппарате Гольджи) и α -лактоальбумин молочными железами. Гепатоциты путем экзоцитоза секретируют альбумин, гликопротеины и липопротеины очень низкой плотности, но каким образом секретируется желчь, неясно, может быть, через особые каналцы.

Различают четыре системы гормональной секреции путем экзоцитоза. Первая система — *нейроэндокринная*, это секреция гормонов типичными железистыми клетками. В этом случае гормоны через кровь и лимфу оказывают влияние на клетки-мишени на значительном расстоянии.

Вторая система — *тканевая*. Например, Т-лимфоциты в культуре ткани при действии антител или митогенов секретируют АКТГ, соматотропин, пролактин. Жировая ткань секретирует женский половой гормон; сердечные мышцы и стенки крупных артерий — пептидный гормон, снижающий содержание Na^+ в клетках, поддерживающий в норме артериальное давление; слюнные железы — эпидермальный фактор роста; печень — инсулиноподобные соматомедины, стимулирующие обмен в мышцах, хряще и жировой ткани; клетки мозга — фактор роста фибробластов.

Третья система — *аутокринная* секреция гормонов, ускоряющая деление эмбриональных опухолевых клеток. Этот тип секреции встречается и в синапсах благодаря наличию пресинаптических ауторецепторов, ослабляющих чрезмерную секрецию медиаторов или, наоборот, усиливающих секрецию.

Четвертая система — *паракринная* секреция веществ из клетки — для обеспечения функционирования небольшого числа соседних, «рабочих» клеток (эпителий кишечника, легкие, желудок). Нередко секрецию медиаторов нервными окончаниями, т. е. экзоцитоз медиаторов и синаптическую передачу информации, выделяют в особую систему секреции.

Механизмы экзоцитоза в целом одинаковы (см. разд. 3.5). Медиаторы в отличие от гормонов секретируются в высокоспециализированном районе экзоцитоза и действуют на клетки-мишени на очень коротком расстоянии. Некоторые нейромедиаторы могут выполнять функции нейрогормона. Например, норадреналин, секретируемый нервными окончаниями (варикозами) гипоталамических адренергических нейронов, которые ничего не иннервируют, выступает как нейрогормон. В то же время норадреналин, секретируемый варикозами этого же нейрона, обеспечивающими иннервацию другого нейрона, выполняет функцию нейромедиатора. Вазопрессин как медиатор быстро (в течение нескольких миллисекунд) влияет на процесс синхронизации нейронов, а как гормон, секретируемый клетками задней доли гипофиза, медленно (в течение нескольких часов) при-

водит к увеличению артериального давления, т. е. сужению кровеносных сосудов, к увеличению реадсорбции воды в почках (проявляет свойства антидиуретика).

3.2. Свойства секреторных клеток

Секреторные клетки выделяют низкомолекулярные соединения (ацетилхолин, биогенные амины, аминокислоты, АТФ и др.), а также в большинстве случаев макромолекулы (пептиды, белки, липопротейны, муцины и др.). Секреторные клетки обладают рядом особенностей. Секреция в большинстве случаев происходит в ответ на высокоспециализированный внешний стимул (нервный импульс, действие химических лигандов — гормонов, медиаторов и др.).

Как правило, секреторные клетки имеют асимметричное строение. В базальной части клеток расположена основная масса цистерн двух типов: ЭПР и аппарат Гольджи. Материал, предназначенный на «экспорт», синтезируется и далее хранится в особых везикулах — секреторных гранулах с мембранной оболочкой. Секретируемые молекулы, согласно сегрегационной модели секреции, постоянно находятся в специализированных компартментах (секреторных гранулах), они изолированы от цитоплазмы. Бокаловидная форма апикальной части клеток объясняется слиянием части гранул между собой и их обводнением, что далее приводит к набуханию этой части клетки. Секреция в ответ на внешний стимул происходит в основном по типу экзоцитоза. Невезикулярная секреция в отличие от экзоцитоза может происходить путем диффузии веществ из цитоплазмы через плазмалемму во внеклеточное пространство (табл. 4). Некоторые иммуноглобулины, NaCl (солевые железы морских во-

Таблица 4. Везикулярная и неvesикулярная секреция веществ

Исследуемые параметры	Везикулярная секреция	Невезикулярная секреция
Хранение вещества	В секреторных гранулах, в высокой концентрации. Например, концентрация катехоламинов в хромаффинных гранулах надпочечников или в адренергических синаптических пузырьках, ацетилхолина в холинергических синаптических пузырьках электрического органа ската составляет 0,6—0,8 М	В цитоплазме, в низкой концентрации. Например, концентрация катехоламинов или ацетилхолина в цитоплазме составляет $\leq 0,1$ мМ
Тип секреции	Экзоцитоз, т. е. контакт гранул с внутренней поверхностью плазмалеммы, слияние мембран	Диффузия, пассивный транспорт
Район секреции	Высокоспециализированный, в апикальном конце клетки, в синапсах	В любом месте плазмалеммы клеток

Исследуемые параметры	Везикулярная секреция	Невезикулярная секреция
Зависимость от Ca^{2+}	Да	Нет
Внутриклеточные индукторы	Ca^{2+} , Mg-АТФ, кальмодулин, цАМФ	Блокаторы везикулярного захвата, например резерпин для катехоламинов
Запуск	Внешний стимул, сопряжение «стимул — секреция», «деполяризация — секреция»	В ответ на чрезмерное накопление в цитоплазме свободных секретиремых веществ
Чувствительность к цитостатикам	Да	Нет
Функция	Физиологическая секреция, основной фонд секреции	Секреция при экстремальных ситуациях, в состоянии покоя, побочный и малый фонд секреции
Дискретность или непрерывность секреции	Дискретная, квантовая, синхронизированная секреция из многих гранул	Непрерывная, неквантовая, постоянная утечка из цитоплазмы

доплавающих птиц), коллаген могут секретироваться отличным от экзоцитоза способом.

Секреторные клетки имеют хорошо развитую сеть ЭПР с системой полисом — рибосом и хорошо развитый аппарат Гольджи с толстыми мембранами, имеющими диаметр 7—8 нм. Существует общий механизм образования, хранения и экзоцитоза секретиремого материала. Синтез белковых секретиремых макромолекул протекает в гранулярном ЭПР, затем материал поступает через мембраны в ЭПР, затем в агранулярный ЭПР и далее в цистерны аппарата Гольджи, в котором происходит посттрансляционная модификация белков, формирование секреторных гранул. После некоторого периода «созревания» гранул (максимальная упаковка содержимого) они сосредоточиваются возле будущего района экзоцитоза, т. е. недалеко от плазмалеммы. Например, в клетках поджелудочной железы синтезируется около 90% белков, которые затем секретируются клеткой (рис. 11).

Процесс секреции состоит из цикла сменяющих друг друга конвейерных процессов, которые при мерокриновой секреции чаще всего накладываются друг на друга. Синтез секретиремого белка в клетке происходит с постоянной скоростью почти на всех стадиях секреторного цикла. После стадии экзоцитоза пептидных гормонов железистыми клетками (стадия экструзии) может происходить, хотя и с низкой эффективностью, диффузия вновь синтезированных пептидов, не успевших «попасть» в

микровезикулы и гранулы. Лиганды, блокирующие экзоцитоз, как правило, вызывают через систему клеточных рецепторов торможение синтеза белка в клетке; справедлива и обратная зависимость: стимул → усиление экзоцитоза → активация синтеза пептидных гормонов. Из всех стадий секреторного цикла лишь стадия экзоцитоза протекает периодически, обусловленная как экзогенными стимулами, так и эндогенными ритмами созревания секреторных гранул.

Секреторный цикл состоит из следующих стадий: синтез, сегрегация белка в ЭПР, внутриклеточный везикулярный транспорт, концентрирование, созревание секреторных гранул, экзоцитоз, рециклизация мембран и гранул. Экзоцитоз протекает различно в клетках со спонтанной и постоянной секрецией и в клетках с регулируемой внешними стимулами секреций

(табл. 5). В некоторых клетках оба пути секреции могут сосуществовать.

Секреторные гранулы происходят из цистерн аппарата Гольджи (см. рис. 3). В случае нейронов образовавшиеся синаптические пузырьки далее транспортируются с быстрым аксотоком из тела клетки по аксону в область нервных окончаний, где происходит синтез медиаторов, везикулярный захват медиаторов из синаптоплазмы и их упаковка в синаптические пузырьки. Все секреторные гранулы имеют уникальный биохимический состав. Они содержат медиаторы или гормоны в очень высокой концентрации (см. табл. 4). В эндокринных клетках концентрация пептидных гормонов в гранулах в 200 раз выше, чем в цистернах аппарата Гольджи; в экзокринных клетках это соотношение равно 9. Секреторные гранулы имеют необычно высокое соотношение липид/белок, равное 5:1. На внутренней поверхности мембран гранул нередко локализованы гликолипиды; мембраны богаты холестерином, сфингомиелином. Во всех случаях показана идентичность содержимого гранул и секретируемых из клетки веществ.

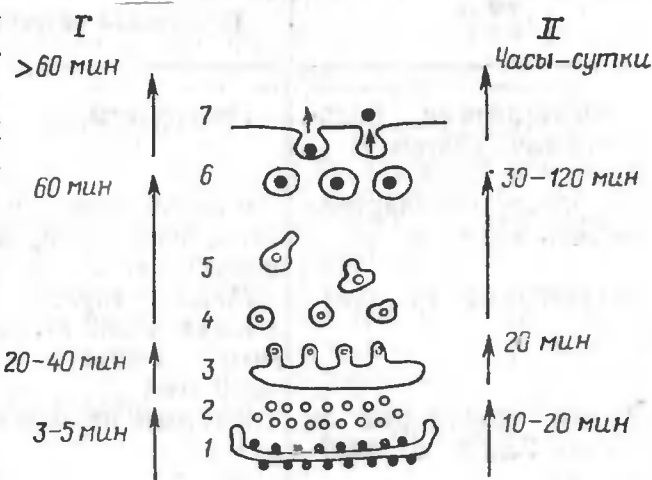


Рис. 11. Секреторный цикл в клетках поджелудочной железы:

I — гранулярный ЭПР (синтез белка и его накопление в цистернах ЭПР); 2 — микропузырьки, образованные из ЭПР (энергозависимый и цитоскелетзависимый процесс); 3 — аппарат Гольджи (накопление и трансформация белка, формирование секреторных гранул, СГ); 4 — незрелые СГ; 5 — созревание СГ, возможное слияние с лизосомами, образование конденсирующих вакуолей; 6 — созревшие СГ; 7 — экзоцитоз;

II — временная последовательность обмена зрелых гранул, содержащих пищеварительные ферменты, ацинарных клеток; II — то же для обмена инсулиновых СГ в β -клетках; стрелками указана временная последовательность процессов после введения меченых аминокислот в клетки (сам акт секреции совершается за очень короткий период времени ≤ 1 мс)

Таблица 5. Постоянная и стимулируемая секреция по типу экзоцитоза

Исследуемые параметры	Постоянная секреция	Стимулируемая секреция
Асимметричные, поляризованные клетки	Гепатоциты, миоциты	Нейроны, эндокринные и экзокринные клетки, сперматоциты
Округлые, неполяризованные клетки	Фибробласты, хондроциты, макрофаги, В-лимфоциты, дрожжи	Нейтрофилы, лаброциты, базофилы, тромбоциты, яйцеклетки
Секреторные гранулы	Мало гранул; они содержат мало секретиремых веществ; $\tau_{50} \approx 10$ мин	Много гранул; они содержат много секретиремых веществ; $\tau_{50} \geq 10$ ч
Время транспорта от системы ГЭРЛ до плазмалеммы	Быстрое, несколько минут	Медленное
Чувствительность к Ca^{2+}	Нет доказательств	Да (стимуляция)
Чувствительность к кислототропным веществам	Нет	Да (торможение)
Роль цитоскелета в транспорте гранул к району экзоцитоза	Минимальная	Максимальная
Специализация района экзоцитоза	Нет (?)	Да

Важным обстоятельством является установление принципиального факта: секреторные гранулы содержат целый набор секретиремых веществ, так называемых *спутников секреции* (табл. 6). В связи с этим возможность передачи информации от клетки к клетке резко возрастает. Нередко спутники локализованы в особых популяциях секреторных гранул одного и того же нервного окончания. Эти границы отличны от тех гранул, в которых локализован лишь классический медиатор с ограниченным количеством спутников; они, как правило, больше по размерам и расположены дальше от района экзоцитоза, чем вышеописанные вторые. Это как бы запасные гранулы. Например, в нервных окончаниях нисходящих путей спинного мозга серотонин выявляется в синаптических пузырьках небольших размеров, а его спутники — полипептид *P* и тиролиберин — в больших везикулах. Предполагают, что в обычных условиях мотонейроны секретируют главным образом серотонин, а при избыточной пресинаптической стимуляции наряду с серотонином секретируются спутники из больших синаптических пузырьков, которые модифицируют как пре-, так и постсинаптические эффекты серотонина, в данном случае усиливая эффект серотонина. Интересен следующий факт: избыточная секреция серотонина самовыключается благодаря наличию в пресинаптических мембранах серотониновых ауторецепторов, если же из серотонинергических нервных окончаний секретируется также и полипептид

Таблица 6. Экзоцитоз спутников секреции классических медиаторов (и гормонов)

Объект	Классические медиаторы	Спутники
Хромаффинные клетки надпочечников, адренергические нервы	Катехоламины	АТФ, хромогранин, дофамин- β -гидроксилаза, мет-энкефалин
Холинергические нейроны нервно-мышечных синапсов	Ацетилхолин	АТФ, неидентифицированные белки
Продолговатый мозг	Серотонин	Нейротензин, полипептид <i>P</i> , тиролиберин, энкефалины
Кора головного мозга, холинергические нейроны, иннервирующие слюнные железы	Ацетилхолин	Вазоактивный кишечный пептид
Таламус мозга	Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК)	Соматостатин
Адренергические нейроны, иннервирующие слюнную железу	Норадреналин	Нейропептид <i>У</i>
Стриатум мозга	Дофамин	Холецистокинин
Преганглионарные холинергические нервы	Ацетилхолин	Энкефалины
Симпатический ганглий	Норадреналин	Соматостатин, гомолог панкреатического пептида
Нейроны подслизистого сплетения	Норадреналин	Соматостатин, холецистокинин
Постганглионарные клетки	Норадреналин	Полипептид <i>P</i> , соматостатин, мет-энкефалин

P, то он отключает такого рода отрицательную обратную связь.

Хромаффинные гранулы надпочечников содержат помимо катехоламинов (0,6—0,8 М) также спутники секреции — АТФ (180 мМ), мет-энкефалины, хромогранин, растворимую дофамин- β -гидроксилазу, а также содержат ионы Са (18 мМ), Mg (5 мМ), Cl⁻ (18—40 мМ), аскорбат (24 мМ). Катехоламины упакованы в матриксе гранул в форме тройного комплекса с АТФ и хромогранином (кислым белком-димером, 80 кД). Мембраны гранул содержат системы Na/Ca-обмена и АТФ/АДФ-обмена. Матрикс гранул имеет рН 5,0—5,3. На внешней поверхности гранул происходит гидролиз АТФ при помощи особой Н-АТФазы немитохондриального типа, сопряженной с АТФ-индуцированным активным захватом катехоламинов из цитоплазмы (везикулярный захват). Н-Насос и сопряженный с ним Cl-канал локализованы в мембранах синаптических пузырьков мозга. Этот насос регулирует везикулярный захват медиаторов или гормонов, их аккумуляцию в везикулах, а также, возможно, участвует и в регуляции экзоцитоза.

3.3. Сигнальная гипотеза

Согласно *сигнальной гипотезе* (1971), необходимая информация о секреции белковых макромолекул находится в молекуле матричной РНК, содержащей сразу вслед за иницирующим кодоном несколько (30—40) триплетов, кодирующих сигнальную (лидерную) аминокислотную последовательность белка. Это своеобразный опознавательный знак белка. Новообразованные полипептидные цепи секретируемых белков, лизосомных ферментов и некоторых интегральных мембранных белков содержат на N-конце сигнальный пептид. Как известно, для многих таких пептидов характерна высокая гидрофобность и наличие 1—2 положительных зарядов на N-конце пептида, т. е. гидрофобному участку предшествует основная аминокислота. Все это облегчает взаимодействие с полярными группами фосфолипидов и прохождение через гидрофобный слой мембран ЭПР.

Синтез белка происходит на свободных рибосомах до тех пор, пока сигнальная последовательность, участвующая в прикреплении рибосом к мембранам ЭПР, не вышла из рибосомы. После этого рибосомы прикрепляются к мембране и синтез белка продолжается. Сигнальный пептид, вероятно, удерживает, как якорь, рибосому и новообразованную пептидную цепь на мембране, его вторая функция — сигнал для транслокации пептидной цепи через мембрану внутрь цистерн ЭПР. Сигнальный пептид не способен связываться с мембранами после того как уже синтезировалась длинная цепь белка, вероятно, из-за того, что при скручивании растущей цепи экранируется участок цепи, служащий для узнавания мембраны. Еще до окончания синтеза белка сигнальный пептид отщепляется с помощью фермента *сигналазы* (пептидазы), находящегося на внутренней поверхности мембран ЭПР. После окончания синтеза белка рибосомы отделяются от мембран и начинается новый цикл.

Сигнальные пептиды обнаружены во многих секретируемых белках различных клеток. Так, кишечные бактерии типа *E.coli* секретируют в периплазму животных клеток щелочную фосфатазу. Этот фермент существует в бактериальной клетке в виде предшественника, от которого ассоциированная с мембраной протеиназа отщепляет сигнальную последовательность, после чего фермент секретируется в периплазму.

В 1982 г. было установлено, что рибосомы связываются с гранулярным ЭПР лишь в том случае, если между ними и мембранами оказываются последовательно встроенными два белка: белок *SRP*, распознающий сигнальный участок синтезируемого белка (250 кД), и белок, рецептирующий сигнальный участок с мембраной (72 кД). Белок *SRP* — РНК-протеин; состоит из 6 субъединиц; при нахождении в цитоплазме вызывает блок трансляции. Этот белок связывается с рибосомами, в которых начался синтез секретируемого белка, и приостанавливает его до тех пор, пока комплекс *SRP* — большая субъединица рибо-

сом не приблизится к рецепторному белку мембраны. В этом случае сигнальный участок узнает центр связывания и «заякоривается» на мембране. Синтез секреторного белка начинается на свободных рибосомах еще до их контакта с мембранами. После того как на свободной рибосоме образовался пептид из 70—80 аминокислотных остатков, имеющих сигнальную последовательность, синтез приостанавливается с помощью *SRP*. 40 аминокислотных остатков находится при этом внутри рибосомы, а сигнальный участок выходит из большой субъединицы рибосомы. Если *SRP* нет, то трансляция не прекращается и белок, появившись в цитоплазме, может быть даже опасным для клетки, если это лизосомный фермент. Сигналаза отщепляет сигнальный пептид раньше, чем закончилась трансляция, но не ранее, чем возникла последовательность из 70—80 аминокислотных остатков. «Запрет» трансляции сохраняется до тех пор, пока не наступит контакт с рецепторным белком мембраны ЭПР (72 кД). Затем трансляция возобновляется, при этом она сочетается с транслокацией полипептидной цепи через мембрану.

Предполагают, что секреторные гранулы могут формироваться и на стадии везикуляризации мембран гладкого ЭПР с последующим транспортом мелких, транзитных везикул к аппарату Гольджи и слиянием этих везикул с цистернами аппарата Гольджи. Мелкие везикулы совершают челночные рейсы от ЭПР к аппарату Гольджи и обратно (опустошаются и возвращаются за новой порцией секреторного материала). Так же вероятен транспорт вновь синтезируемых белков по особым каналам, соединяющим ЭПР и аппарат Гольджи. Надо признать, что оба механизма равновероятны, и ни один из них экспериментально не обоснован. Затем процесс протекает так: везикуляризация мембран цистерн аппарата Гольджи — слипание мелких везикул в вакуоли, преобразование вакуолей в протосекреторные («зимогенные») гранулы, которые по пути к району экзоцитоза, т. е. к апикальной части клеток, «созревают» (см. рис. 11).

Большинство секреторируемых белков синтезируется в форме предшественников с большой молекулярной массой (например, препроинсулин $\approx 11,5$ кД). Эти предшественники секреторируемых белков, белков-гормонов претерпевают ограниченный протеолиз уже при везикуляризации мембран аппарата Гольджи и особенно эффективно в ходе «созревания», конденсации секреторных гранул, т. е. при слиянии первичных везикул с лизосомами. Другими словами, «зрелые» секреторные гранулы, по сути дела, специфические вторичные лизосомы, содержащие большой спектр лизосомных ферментов, главным образом, кислые протеиназы.

Вновь синтезированный прогормон в цистернах ЭПР и аппарата Гольджи претерпевает следующие посттрансляционные модификации: удаление сигнального пептида, ферментативное присоединение к N-концу гетеросахаридных цепей и образование дисульфидных мостиков, последующий ограниченный протеолиз.

Последние три процесса протекают в различных компартментах системы ГЭРЛ.

Рассмотрение сигнальной гипотезы приводит к интересным обобщениям, касающимся *эволюции процессов секреции*. Прimitивная клетка не имела органелл, а мембрана состояла лишь из липидного бислоя. Вновь синтезированные белки с гидрофобными участками постепенно встраивались N-концом в мембрану, оставаясь соединенными с рибосомами, при этом внутри мембраны задерживалась гидрофобная часть молекулы пептида. В ходе эволюции рибосомы более часто контактировали с мембранами и все более «засоряли» мембрану пептидами, часть из них оказывалась и снаружи мембраны.

Важным этапом эволюции мембран было отщепление сигнального участка пептидной цепи, в результате чего мембрана приобрела липопротеиновые комплексы. Дальнейшая эволюция секреции и транспортного механизма была связана с появлением углублений плазмалеммы, что создавало условия для посттрансляционных модификаций и конденсации секреторного материала. Вокруг углублений рибосомы располагались более густо. Инвагинации замыкались и обособлялись от плазмалеммы, образовывая примитивный ЭПР, а каналы связи ЭПР с плазмалеммой преобразовывались в аппарат Гольджи и лизосомы — возникновение системы ГЭРЛ.

На высших ступенях эволюции первоначальный способ цитозольной секреции — путем транспорта через клеточную мембрану — перестал быть основным способом секреции, так как возник экзоцитозный секреторный цикл. Спонтанная периодичность секреторной активности, а также вызванная периодичность экзоцитоза являются проявлением экономной формы жизнедеятельности клеток. Секреция «полезных», биологически активных веществ возникла из неспецифической экскреции, которая существовала на ранних стадиях эволюции клеток как элемент обмена веществ между клеткой и средой, как удаление из клетки ненужных, вредных продуктов метаболизма.

3.4. Секреция ферментов и белков

Клетки некоторых типов (особенно, лейкоциты и макрофаги) способны секретировать по типу экзоцитоза лизосомные ферменты (см. рис. 4, 6), причем у макрофагов этот процесс длителен и может перейти в патологическую реакцию (при воспалении). Секреция лизосомных ферментов объясняется разными причинами; она может быть сопряжена с фагоцитозом, например первичные лизосомы слипаются с плазмалеммой, или с фагосомой, которая еще не отделилась от плазмалеммы (особенно это характерно для «незавершенного» фагоцитоза). Накопление в клетке плохо перевариваемого фагоцитированного вещества может стимулировать высвобождение нейтральных протеиназ из гранул нелизосомного происхождения. Секреция ферментов мо-

жет индуцироваться лигандрецепторным взаимодействием, при этом одновременный эндоцитоз лиганда не обязателен.

Секреция лизосомных ферментов не является исключительным свойством специализированных фагоцитирующих клеток. Например, данная секреция в ответ на гормональные стимулы наблюдается при резорбции кости, при накоплении сахарозы в лизосомах клеток хряща или при стимуляции этих клеток витамином А. Секретируемые ферменты могут сорбироваться в слое гликокаликса. В зоне щеточной каемки кишечного эпителия млекопитающих (а эта зона богата гликокаликсом) обнаруживается масса различных ферментов собственного и панкреатического происхождения, необходимых для внеклеточного пищеварения. Опухолевые клетки секретируют лизосомные ферменты, которые устраняют межклеточные контакты, например, щелевидные контакты. Таким образом, раковые клетки в тканях высших организмов расчищают себе путь благодаря секреции лизосомных ферментов.

Сложным путем происходит *секреция сывороточных белков печени*. Проальбумин синтезируется в гранулярном ЭПР, транспортируется в агранулярный ЭПР, затем в аппарат Гольджи и далее запасается в пресекреторных гранулах (пре-СГ). Последние сливаются со специализированными первичными лизосомами с образованием секреторных гранул, в которых происходит ограниченный протеолиз и образование альбумина. В итоге секреторная гранула слипается с плазмалеммой и путем экзоцитоза белок секретируется во внеклеточную среду. Протеиназы остаются в связанном виде с плазмалеммой и в дальнейшем могут вновь попасть в клетку в ходе эндоцитоза. Таким путем секретируются многие полипептидные гормоны и медиаторы, образование которых в клетке связано с ограниченным протеолизом, например инсулин, ангиотензин, глюкагон, гастрин, энкефалины и др.

Макрофаги являются полисекреторными клетками: в зависимости от условий секретируют различные вещества. Они секретируют лизосомные гидролазы при действии иммунолигандов и других индукторов фагоцитоза, активатор пламиногена при действии тиюгликолата, коллагеназу и пироген при действии эндотоксина, лизоцим, простагландины при действии иммунолигандов. Макрофаги постоянно секретируют лизоцим, секретируют также компоненты комплемента и α_2 -макроглобулин, причем природа стимулов неизвестна.

Фибробласты при стимуляции секретируют нейтральные протеиназы. Секреция двух типов гидролаз (кислых и нейтральных) инициирует разнообразные каскадные процессы в крови. В этом разделе еще раз уместно отметить, что эндоцитоз и экзоцитоз — взаиморегулируемые и взаимосвязанные процессы. Иногда эндоцитозу предшествует экзоцитоз ферментов. Например, в состав соединительной ткани входит коллаген — волокнистая, полимерная структура. Секретируемая коллагеназа сначала рас-

щепляет интактные фибриллы, а образованные отдельные макромолекулы подвергаются эндоцитозу.

Процесс стимуляции секреции лизосомных ферментов может саморегулироваться в течение определенного времени. Некоторые из активных компонентов каскадной системы комплемента являются индукторами секреции лизосомных ферментов из макрофагов и нейтрофилов.

Макрофаги и фибробласты в очагах воспаления секретируют комплемент С3 и нейтральные протеиназы, которые расщепляют С3 до С3b, последний, в свою очередь, усиливает секрецию комплемента С3 и лизосомных ферментов. Таким образом поддерживается непрерывное высвобождение ферментов. Иной способ секреции лизосомных ферментов фагоцитами предполагают в случае гибели опухолевых клеток «неиммунологическим путем». При этом допускают, что лизосомные ферменты не секретируются в среду, а прямо высвобождаются в цитоплазму клеток-мишеней. Таким же способом лимфоциты «убивают» клетки.

Экзоцитоз лизосомных ферментов в различных клетках индуцируется эндоцитозом. Другими словами, наряду с феноменом *усиленного эндоцитоза после экзоцитоза* (см. разд. 2.6) существует и *феномен усиленного экзоцитоза после эндоцитоза*. Снижение эндоцитоза в лейкоцитах при помощи увеличения уровня цГМФ или торможения выхода Ca^{2+} из клетки приводит к снижению секреции лизосомных ферментов из этих клеток.

Своеобразен механизм *секреции тиреоидного гормона*. Сначала гормон в коллоидной форме в комплексе с крупным белком (тиреоглобулин) высвобождается в просвет фолликула щитовидной железы. Далее под влиянием тиреотропного гормона происходит быстрый эндоцитоз тиреоглобулина эпителиальными клетками. После слияния эндосом с первичными лизосомами с помощью ограниченного протеолиза образуется низкомолекулярный гормон тироксин, который диффундирует из вторичной лизосомы и далее путем диффузии проникает в ближайший кровеносный капилляр.

Экзоцитоз важен в процессе *оплодотворения клеток*. Сперматозоиды содержат особые секреторные гранулы — *акросомы*. Они располагаются над ядром в переднем конце сперматозоида в ожидании контакта с оболочками яйца. В момент оплодотворения акросома сливается с плазмалеммой сперматозоида, при этом секретируются пищеварительные ферменты, которые разрушают оболочки яйцеклетки, помогая сперматозоиду добраться до плазмалеммы яйцеклетки.

Экзоцитоз необходим для *внеклеточного пищеварения*. Так, гетеротрофные бактерии и грибы секретируют пищеварительные ферменты в окружающую примембранную среду и затем усваивают продукты распада. Это свойство дрожжей используется в биотехнологии. Клетки «научили» синтезировать гормон роста человека. В одной серии опытов использовали лидерную последовательность самого человеческого гормона, в другой — «мест-

ную» лидерную последовательность аминокислот, присущую одному из секретируемых белков дрожжевой клетки. Оказалось, что «местный» лидер лучше секретирует человеческий гормон в клетках дрожжей.

3.5. Механизмы экзоцитоза

Экзоцитоз медиаторов нервными окончаниями и гормонов железистыми клетками наиболее изучен. Процесс этот многостадийен. *Первый этап* — сопряжение деполяризации и секреции. Сопрягающим фактором является накопление свободных ~~ионов Са~~ ²⁺ с 10^{-7} — 10^{-8} до $\geq 10^{-6}$ М при возбуждении клеток. Дополнительными факторами сопряжения могут быть обратимая инактивация электрогенного Na, K-насоса плазмалеммы и активация системы цАМФ, точнее, цАМФ-зависимого фосфорилирования субстратов, участвующих в реализации на определенных стадиях процесса секреции.

Многочисленные морфологические исследования обнаружили существенные изменения ультраструктуры синапсов при интенсивной пресинаптической стимуляции наряду с Са-зависимой секрецией медиаторов. Обнаружено просветление гранулярных синаптических пузырьков; скопление их близ пресинаптической мембраны; частичная агрегация и увеличение ассоциации синаптических пузырьков вблизи активной зоны синапсов; снижение количества синаптических пузырьков и уменьшение их диаметра (сморщивание); увеличение размеров терминалей (набухание нервных окончаний); увеличение размеров активной зоны пресинаптической мембраны (увеличение площади контакта); увеличение количества асимметричных синапсов, т. е. увеличение утолщений постсинаптических мембран; нередкий контакт с пресинаптической мембраной сдвоенных синаптических пузырьков: когда первая слипшаяся везикула является триггером для последующего слипания с ней другой везикулы и именно после этого инициируется слипание «двойной» везикулы («восьмерки») с плазмалеммой; увеличение числа экзоцитозных синаптических пузырьков, т. е. структур типа «омега»; появление округлых вдавливания в пресинаптической мембране (пунктов слияния); перемещение митохондрий к району секреции; образование глубоких складок в участках аксолеммы между активными зонами синапсов; формирование зоны состыковки, т. е. увеличение конических выступов с кратероподобными отверстиями на вершине. Все вышеописанные изменения обратимы.

При деполяризации мембран нейронов или железистых клеток открываются в течение миллисекунд ионные каналы. Сначала открываются Na-каналы, по которым в клетки, в основном в нервные окончания, может входить некоторое количество ионов Са. Последние не инициируют в цитоплазме секреторный процесс, но могут индуцировать изнутри дополнительное открытие собственных Са-каналов. Затем открываются Са-каналы, по ко-

торым в цитоплазму поступает основное количество ионов Са, их накопление до определенного предела индуцирует, запускает секреторный процесс. В последнюю очередь открываются потенциалзависимые К-каналы, выход ионов К по которым самоостанавливает процесс деполяризации, способствует реполяризации мембран. При возбуждении клеток промежуточной доли гипофиза Са²⁺ поступает внутрь в основном через Na-канал, а при возбуждении клеток передней доли гипофиза, опухолевых клеток ионы Са поступают внутрь исключительно через Са-канал.

Известен ряд веществ, которые специфически блокируют или открывают ионные каналы и тем самым влияют на процесс экзоцитоза (табл. 7).

Таблица 7. Ингибиторы и активаторы ионных каналов

Тип канала	Ингибиторы	Активаторы
Потенциалзависимый Na-канал	Извне: тетродотоксин (10 ⁻⁸ —10 ⁻⁷ М), сакситоксин, анестетики	Извне: вератридин, батрахотоксин, аконитин, грайанотоксин Извне (модификация воротного устройства): пептидные яды скорпиона, актиний Изнутри: Са-кальмодулинзависимое фосфорилирование
Потенциалзависимый Са-канал	Извне: ионы Mg (15—20 мМ), Cd (0,1—1,0 мМ), верапамил, нифедипин, фелодипин, риоцидил, дилтиазем, анестетики. В бескальциевой среде трансформация в Na-канал Изнутри: избыток Са ²⁺	Извне: 1,4-дегидропиридины (Bayk 8644, CGP 28392) Изнутри: цАМФ-зависимое фосфорилирование
Потенциалзависимый К-канал (быстро инактивирующийся)	Извне: тетраэтиламмоний (5 мМ); 1,4-диаминопиридин (<0,1 мМ)	—
Потенциалзависимый К-канал (медленно инактивирующийся)	Извне: фенциклидин	—
Потенциалнезависимый вход Na ⁺ (может быть, Na/H-обмен)	Извне: амилорид (0,1 мМ); 2, 4, 6-триаминопиридин, тетраэтиламмоний, 4-аминопиридин	Изнутри: альдостерон
Са-индуцируемый К-канал	Извне: апамин, хинин, тетраэтиламмоний	Извне: 4-аминопиридин Изнутри: Са ²⁺ , возможно Са-кальмодулинзависимое фосфорилирование

Инактивация Na, K-АТФазы плазмалеммы при возбуждении приводит к снижению трансмембранного потенциала, а значит, к триггерному эффекту: к еще большему открытию ионных каналов или к удлинению временных сроков «открытого» состояния ионных каналов, к увеличению входа ионов Са и к запуску процесса экзоцитоза. Многочисленными опытами установлено, что уабаин — блокатор Na, K-насоса — индуцирует секрецию различных медиаторов и гормонов. Инактивация Na, K-АТФазы при возбуждении может происходить либо вследствие структурных перестроек, фазовых переходов в мембранах, либо путем воздействия изнутри на плазмалемму внутриклеточных регуляторных систем (цАМФ, ионы Са — кальмодулин и др.), «включающихся» на ранних этапах процесса возбуждения, деполяризации мембран.

Многочисленными опытами доказана *исключительная зависимость экзоцитоза от ионов Са* во внешней среде. Удаление Ca^{2+} из среды или добавление в среду Са-комплексона — ЭГТА или ингибиторов Са-каналов (см. табл. 7) приводит к резкому торможению или практически полному прекращению Са-зависимой секреции медиаторов нервными окончаниями и гормонов железистыми клетками. Ионофоретическое введение Ca^{2+} в гигантский аксон кальмара в концентрации 1—10 мкМ при отсутствии деполяризующих воздействий индуцирует процесс секреции ацетилхолина путем экзоцитоза. Электрофизиологический анализ секреции ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах показал, что в состоянии покоя (без деполяризации мембран) также происходит Са-зависимая секреция медиатора путем экзоцитоза, а секретируемый ацетилхолин генерирует в постсинаптической мембране мышц так называемый миниатюрный потенциал. В этом случае экзоцитоз индуцируется случайным (по типу броуновского столкновения частиц) контактом синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной, а кроме того, и достаточно «закономерным» контактом, индуцируемым локальным накоплением Ca^{2+} в примембранной области за счет постоянного, хотя и небольшого входа Ca^{2+} в клетку из внешней среды, и локального высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо хранения.

При стимуляции клеток химическими агентами (медиаторы, гормоны), т. е. при взаимодействии лиганда с рецепторами могут открываться химически возбудимые Са-каналы, которые далее способствуют накоплению ионов Са в клетке и запуску секреторного процесса. Указанные Са-каналы контролируются циклом фосфатидной кислоты в мембране. При лигандрецепторном взаимодействии активируется обмен фосфоинозитидов плазмалеммы, при этом образующаяся фосфатидная кислота может выступать в роли Са-ионофора.

Может ли быть достаточным фактором индукции секреторного процесса лишь накопление Ca^{2+} в клетке при возбуждении? Исследования последних лет указывают, что этого условия не-

достаточно для запуска экзоцитоза. Уже ранние исследования 60—70-х годов указывали на биохимическую основу многостадийного секреторного процесса: зависимость от температуры, биоэнергетических процессов. Главным достижением этой серии работ явилось строгое доказательство необходимости еще одного индуктора экзоцитоза помимо микромолярных концентраций Ca^{2+} — миллимолярных концентраций Mg-ATP . Блокаторы окислительного фосфорилирования, ингибиторы гликолиза и дыхания прекращают экзоцитоз во многих клетках.

Ясно, что необходимость Mg-ATP для многих стадий экзоцитоза диктуется двумя обстоятельствами: либо тратой Mg-ATP как субстрата некоей АТФазы, либо тратой Mg-ATP как косубстрата протеинкиназы, фосфорилирующей определенные белки и ферменты в цепи стадии экзоцитоза. Данная трата АТФ после возбуждения нервных окончаний восполняется компенсаторной реакцией — значительным усилением дыхания, окислительного фосфорилирования и гликолиза. Таким образом, процесс деполаризации мембран терминалей наряду с тратой АТФ на экзоцитоз синхронно включает и компенсаторный процесс — синтез АТФ в митохондриях и цитоплазме за счет гликолиза.

Более подробный анализ работ последних лет указывает на то, что химическими индукторами экзоцитоза являются ионы Ca , Mg-ATP , кальмодулин и цАМФ. Интересные опыты проведены с изолированными клетками мозгового слоя надпочечников. При помощи краткосрочной электростимуляции суспензии или краткосрочной обработки клеток детергентами в низкой концентрации (сапонин, дигитонин) осуществляли «электрический» или «химический» пробой мембран, т. е. создавали в мембранах «поры», благодаря которым можно регулировать внутриклеточный состав и регулировать экзоцитоз катехоламинов и их спутников секрции. Данный пробой мембран не повреждал аппарат секрции, не опустошал хромоаффинные гранулы, но способствовал цитоплазматической утечке содержимого клеток во внешнюю среду (например, лактатдегидрогеназа как цитозольный растворимый фермент вытекала во внешнюю среду). Оказалось, что действительно Ca^{2+} (1—10 мкМ), кальмодулин (1—10 мкМ), Mg-ATP (1—5 мМ) индуцируют экзоцитоз катехоламинов, АТФ, хромогранина, дофамин- β -гидроксилазы и энкефалинов в среду инкубации.

В последнее время показано, что нервные окончания содержат пресинаптическое гетеро- и ауторецепторы, модулирующие секрецию медиаторов.

На сегодня из всех гипотез наиболее разработана и представляется перспективной и конструктивной — *механо-химическая концепция экзоцитоза*.

Вторым этапом экзоцитоза является транспорт секреторных гранул по нитям цитоскелета к району экзоцитоза, к активной зоне синапсов в случае нейронов (в нервных окончаниях синаптические пузырьки всегда мигрируют при возбуждении в опреде-

ленном направлении — к пресинаптической мембране). О связи цитоскелетной сети, состоящей из микротрубочек, нейрофиламентов и актиновых микрофиламентов (и миозиновых фибрилл), с пресинаптическими мембранами свидетельствуют электронно-микроскопические и биохимические исследования. Здесь необходимо напомнить важную аксиому в биологии: если цитостатики (митотические алкалоиды) выключают какую-либо двигательную функцию в клетке, то в реализации этой функции участвует тот или иной элемент цитоскелета. Эта аксиома «срабатывает» и в данном случае. Многочисленными опытами установлено, что цитостатики (колхицин, винбластин, цитохалазины) блокируют вызванную Са-зависимую секрецию медиаторов или гормонов.

Что происходит с цитоскелетными структурами при возбуждении клеток и как они осуществляют двигательные функции? При возбуждении нейронов микротрубочки разбираются за счет цАМФ-зависимого фосфорилирования высокомолекулярных белков, ассоциированных с микротрубочками, и в некоторой степени тубулина, а также за счет Са-зависимого (при участии кальмодулина — СаМ) фосфорилирования тубулина, причем в первом случае фактором, предотвращающим разборку, служит фосфодиэстераза циклических нуклеотидов, во втором — белок τ , инактивирующий СаМ. Оба типа протеинкиназ, белок τ и, возможно, фосфодиэстераза являются интегральными минорными компонентами микротрубочек. В физиологических условиях разборка нейрофиламентов при возбуждении нейронов происходит за счет Са(СаМ)-зависимой протеинкиназы и Са-зависимой цитозольной протеиназы. Видимо Са-зависимая разборка микротрубочек и нейрофиламентов стратегически оправдана для реализации двигательных функций.

Образование комплекса актомиозина в нейронах, что важно для реализации двигательных функций, зависит от многих факторов: от белковых эндогенных факторов, усиливающих сборку микрофиламентов из глобулярного актина, т. е. Г-актина; от Са(САМ)- и цАМФ-зависимого фосфорилирования легких цепей миозина в цитозоле; от Са(СаМ)-зависимого фосфорилирования Г-актина и тропонина С в синаптических мембранах; от связывания Ca^{2+} с тропонином С.

Источником энергии для механической работы во всех цитоскелетных структурах является гидролиз АТФ, осуществляемый актомиозин-подобной АТФазой, тубулин-динеиновой АТФазой в составе микротрубочек или АТФазой в составе нейрофиламентов. Существует точка зрения, что активная роль в генерации движения принадлежит системе актин — миозин, а пассивная — микротрубочкам и нейрофиламентам, по которым как «по рельсам» скользят, двигаются различные органеллы и везикулы.

Все элементы цитоскелета взаимосвязаны и ассоциируются с мембранами. Однако для всех трех сократительных структур характерны, очевидно, универсальные принципы генерации дви-

жения. Во-первых, генерация движения происходит вследствие скольжения одной цитоскелетной нити относительно другой, при этом длина нити не изменяется. Контактным участком в этом случае могут быть пара актин — миозин, актин — динеин, тубулин — миозин данных структур, т. е. гомологичные и гетерологичные контакты. Если одна цитоскелетная нить ассоциирована с клеточной мембраной, а другая — с мембранами каких-либо органелл или везикул, то при скольжении нитей частицы будут двигаться в ту или иную сторону пульсами (толчками) с определенной скоростью. Различие в скорости движения может определяться как типом частицы, так и типом скользящей нити. Направление движения зависит от того, каким концом полярно организованная цитоскелетная нить связана с плазмалеммой, с какой полярной структурой связана та или иная органелла.

Во-вторых, генерация движения может происходить путем управляемой сборки — разборки цитоскелетных нитей, при этом длина нити изменяется. Изменение длины нити модифицирует внутриклеточный транспорт органелл и везикул; разборка нитей вплоть до потери контакта с плазмалеммой может модифицировать подвижность и кластеризацию интегральных белков мембран. При возбуждении нейронов и железистых клеток увеличивается уровень Ф-актина, т. е. ускоряется сборка актиновых микрофиламентов из Г-актина. Например, цепь актиновых микрофиламентов удлиняется преимущественно с одного конца и деполимеризуется, укорачивается с другого. Во втором предполагаемом типе генерации движения не совсем ясна роль Mg-АТФ, хотя и известно, что нуклеотиды (АТФ, ГТФ) принимают участие в сборке — разборке непосредственно и опосредованно через систему фосфорилирования белковых субъединиц цитоскелета. Возможно также сочетание двух вышеописанных форм генерации движения.

В 1985 г. появилась серия работ о выделении из аксоплазмы гигантских аксонов кальмара белка кинезина, который обладает АТФазной активностью иной, чем у миозина и диненина. В опытах *in vitro* кинезин в присутствии АТФ индуцировал транспорт искусственных органелл (шарики латекса) вдоль изолированных микротрубочек мозга (шарики предварительно смачивали в растворе кинезина). В присутствии негидролизуемого аналога АТФ этот транспорт прекращался, а органеллы оставались прикрепленными к микротрубочкам. Данная двигательная система отлична по способу подвижности от той, что осуществляется в мышцах и ресничках. Возможно, что кинезин имеет отношение к АТФазе нейрофиламентов.

Третьим этапом процесса экзоцитоза является «состыковка» секреторных гранул с комплементарными, особыми участками внутренней поверхности плазмалеммы в районе экзоцитоза. На этом этапе также возможно участие цитоскелета как для состыковки, так и для формирования *состыковочного центра*, места удержания секреторных гранул с плазмалеммой. Это удержание

необходимо, так как обилие отрицательно заряженных групп внешней поверхности мембран гранул и внутренней поверхности плазмалеммы не позволяет гранулам состыковаться, хотя бы из-за электростатического отталкивания.

В пресинаптических мембранах синапсов центральной и вегетативной нервной системы находятся гексагональные, плотные выступы, обращенные внутрь синаптоплазмы (высота 50—60 нм, расстояние между вершинами 80—100 нм), они состоят, видимо, из филаментозных структур. Участок между выступами (выростами) является комплементарным участком взаимодействия синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной.

В нервно-мышечных синапсах, в некоторых железистых клетках (нейрогипофиз, β -клетки поджелудочной железы) и других секреторирующих клетках (лейкоциты, тучные клетки) район экзоцитоза имеет свою специфику. Плазмалемма в районе экзоцитоза содержит крупные конусообразные белковые внутримембранные частицы (7—12 нм), которые нередко в форме правильного двойного кольца обрамляют место слипания секреторных гранул. Морфологические исследования экзоцитоза в нейронах нейрогипофиза, мотонейронах спинного мозга, тучных клетках, в электрическом органе электрического ската показали, что в мембране, окружающей некоторые из экзоцитозных отверстий, резко снижено число малых белковых внутримембранных частиц (ВМЧ) диаметром 5—8 нм, которые в других участках мембраны более многочисленны и равномерно распределены. В зоне слияния с мембраной гранул плазмалемма свободна от ВМЧ. На мембране синаптических пузырьков плотность больших ВМЧ (≥ 9 —13 нм) совпадает с плотностью этих частиц на внутренней поверхности пресинаптической мембраны, а плотность малых частиц на мембране синаптических пузырьков в зоне контакта также снижается. В безкальциевой среде двойной ряд больших ВМЧ в нервно-мышечных синапсах исчезает. Этот факт указывает на то, что эти структуры преходящи, они преформируются в ходе деполяризации мембран терминалей.

Наличие агрегатов ВМЧ на мембране секреторных гранул в области контакта с плазмалеммой было показано также в нейрогипофизе и в поджелудочной железе. Таким образом, кластеризация интегральных белков и удаление их из зоны слияния (см. гл. 4) является необходимым условием контактирующих мембран при экзоцитозе.

В синаптических мембранах на внутренней стороне локализуется *спектрин* — регуляторный белок системы актин — миозин. Функция этого белка связана с регуляцией встраивания актиновых микрофиламентов в клеточные мембраны. В покое спектрин в мембранах существует в форме димера (α — 240, β — 235 кД), при возбуждении спектрин в присутствии Ca^{2+} превращается в тетрамер ($\alpha_2\beta_2$ с размерами — 196×4 —6 нм). Тетрамер спектрин стимулирует полимеризацию Г-актина в Ф-актин; связывает

ся с Ф-актином, образуя с актиновыми микрофиламентами сетевидные структуры.

Таким образом, спектрин в синаптических мембранах является стабилизатором, регулятором ассоциации с мембранами сети активных микрофиламентов. Эта спектрин-актиновая сеть, формируемая при возбуждении нейронов, может быть составной частью состыковочного центра в ходе экзоцитоза. Приведенные факты указывают, что при возбуждении нейронов увеличивается количество микрофиламентов, связанных с синаптическими мембранами, а также то, что эктоплазма — это динамическая и пластичная структура, меняющаяся при смене состояний покой — возбуждение. Состыковочный центр при деполяризации мембран может кластеризоваться (при участии Ca^{2+} , спектрина и сократительных структур), образуя ансамбли, которые обуславливают периодичность вызванной секреции, синхронность выброса больших количеств медиаторов из множества синаптических пузырьков.

Как уже упоминалось, при возбуждении нейронов и железистых клеток часть цитоскелетных структур (микротрубочки и промежуточные филаменты) разбирается, т. е. в покое секреторные гранулы не подходят к плазмалемме, поскольку она окружена сетью цитоскелета. Разборка указанных цитоскелетных нитей необходима для транспорта гранул к району экзоцитоза. Например, при экзоцитозе в клетках корневых апексов ячменя состыковочный центр устроен так, что в плазмалемме и мембране секреторных везикул имеются «свой» Са-связывающие белки. После образования кальциевого мостика между мембранами указанные белки вытесняются на периферию контакта, далее индуцируется слияние мембран.

Четвертая стадия экзоцитоза включает в себя Са-зависимое слипание и возможное последующее слияние секреторных гранул с плазмалеммой (рис. 12).

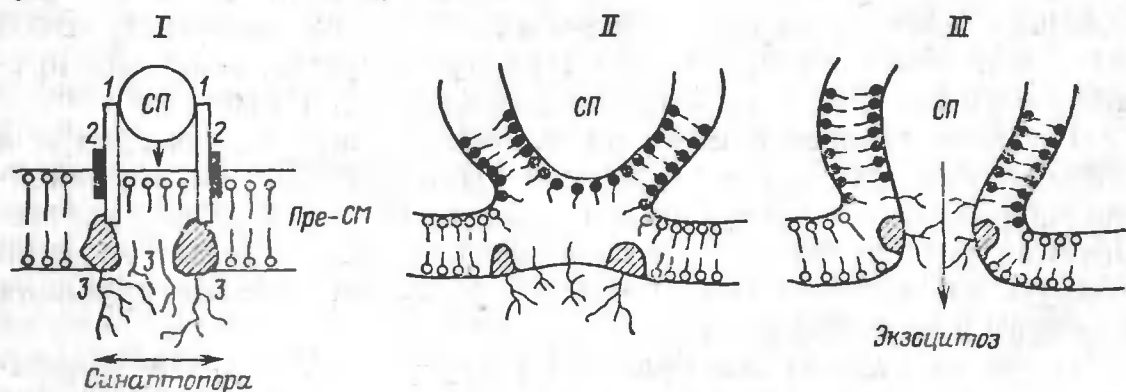


Рис. 12. Последовательность процессов (I—III) при контакте синаптических пузырьков (СП) с пресинаптической мембраной (пре-СМ):

1 — актиновые микрофиламенты, 2 — тетрамер спектрина, 3 — гликопротеин (или гликолипид); стрелка указывает направление движения СП (при участии системы актин — миозин) к комплементарному участку пре-СМ; актин и тубулин находятся в синаптических мембранах в форме комплексов с гликопротеинами или гликолипидами, что указывает на «глубокое» погружение в липидный бислой микрофиламентов и микротрубочек

На микрофотографиях часто удается зафиксировать секреторные гранулы в тот момент, когда их мембрана слипается с плазмалеммой, при этом образуются поры (так называемые омега-подобные структуры, напоминающие по своей форме греческую букву), через которые содержимое гранул секретировается во внешнюю среду.

Техникой замораживания — скалывания экзоцитоза гистамином при стимуляции молочной железы хемотаксическим пептидом показано, что слипание начинается с образования точечных контактов между плазмалеммой и мембраной секреторных гранул, далее формируются многочисленные точечные контакты диаметром 0,05—0,08 мкм. Затем в области контакта при возрастании экзоцитозного «кармана» (поры) отмечено изменение формы слипшихся гранул. Гетерологичное межмембранное слипание, чаще всего, приводит к образованию поры (фаза открытия, образования экзоцитозного кармана). Предполагают, что на внешней стороне плазмалеммы будущей поры находятся гликопротеины (рис. 12). По цитохимическим данным, район, где в ходе экзоцитоза наблюдается увеличение площади плазмалеммы, отличается усилением включения лектинов. Фаза открытия пор происходит между большими белковыми ВМЧ, конусы этих частиц, обращенные в цитоплазму, могут быть центром связывания элементов цитоскелета. Для некоторых клеток при экзоцитозе нет фазы открытия поры, а наблюдается лишь просвет между внутримембранными частицами.

Существует два альтернативных варианта экзоцитоза. В первом случае секреторная гранула после слипания (контакта) и последующей секреции полностью не сливается с плазмалеммой, а каким-то образом отделяется от мембран и используется повторно в ходе последующего возбуждения нейронов или железистых клеток. Отделение гранул от мембран можно представить по аналогии с диссоциацией актомиозинового комплекса после снижения концентрации свободных ионов Ca в цитоплазме клетки, при этом элементы системы актин — миозин связаны соответственно с гранулами и плазмалеммой.

Во втором случае (более общепринятом) происходит полное слияние мембран гранул с плазмалеммой, при этом контакт гранул с плазмалеммой заканчивается «гибелью» гранул. И в первом, и во втором случаях на последних стадиях экзоцитоза выдавливание содержимого во внеклеточную среду через экзоцитозный «карман» может происходить как хемиосмотически, так и за счет двигательных реакций системы актин — миозин. Гиперосмотичность «цитоплазмы» секреторных гранул при образовании экзоцитозного просвета способствует дальнейшему выдавливанию содержимого в окружающую среду.

Анализ данных электронной микроскопии при замораживании сколов препаратов нервно-мышечных синапсов показал, что слияние является временным и встроившийся в плазмалемму «новый» мембранный материал удаляется при помощи латеральной

диффузии из района экзоцитоза, а затем происходят усиление эндоцитоза после экзоцитоза и рециклизация секреторных гранул (см. разд. 2.6). Стадии слияния предшествует стадия межмембранного узнавания (состыковка и слипание). Для некоторых секреторных клеток (мотонейроны, околоушная железа) доказано, что мембраны гранул и плазмалемма не перемешиваются, а остаются в сегрегированном состоянии. Феномен сегрегированности мембран объясняет парадокс, почему при полном слиянии мембран гранул и плазмалеммы не унифицируется белково-липидный состав этих мембран (белково-липидный состав мембран, участвующих в цикле экзоцитоз — эндоцитоз: ЭПР, секреторные гранулы, лизосомы, эндосомы, плазмалемма — отличается друг от друга).

После полного слияния синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной нервно-мышечных синапсов лягушки отмечено наличие ВМЧ, характерных для пузырьков, на внешней стороне двойных рядов ВМЧ, обнаруженных для плазмалеммы. В нервных окончаниях и железистых клетках всегда содержится избыточное количество секреторных гранул. Удаление избытка гранул происходит при экзоцитозе, а также благодаря их слиянию с лизосомами. Последний процесс может усиливаться при подавлении секреции. Это явление описано для клеток гипофиза, фибробластов и печени.

По данным морфологических исследований, действие блокаторов Са-канала и цитостатиков приводит к однотипному ответу: прекращению экзоцитоза и скоплению синаптических пузырьков близ активной зоны. Ионы Са, накопившись в цитоплазме после возбуждения клеток, способны активировать фосфолипазу A_2 , приводя к увеличению лизолецитина и свободных жирных кислот, или фосфолипазу D, приводя к удалению полярных головок фосфолипидов. Все это может способствовать контакту гидрофобных областей бислоев мембран.

Известны исследования, моделирующие экзоцитоз. Из клеточных мембран мозгового слоя надпочечников выделен Са-связывающий белок *синексин* (47 кД), находящийся на внутренней поверхности мембран. Для изолированных хромаффинных гранул агрегация индуцируется высокими концентрациями Ca^{2+} (1 мМ), в присутствии же синексина агрегация хромаффинных гранул запускается низкими концентрациями Ca^{2+} (6 мкМ). Предполагают, что синексин входит в состыковочный центр в места экзоцитоза и регулирует продолжительность контакта хромаффинных гранул с плазмалеммой. Состыковка может протекать следующим путем: синексин плазмалеммы $\rightarrow Ca^{2+} \rightarrow$ фосфолипиды или белки мембран хромаффинных гранул, т. е. путем образования комплекса Ca^{2+} с $COOH$ -группами синексина и анионными группами фосфолипидов (или белков) мембран хромаффинных гранул. Синексин в присутствии Ca^{2+} способен к самоагрегации, полимеризации, вызывая модификации элементов цитоскелета в состыковочном центре.

Са-Индуктируемая агрегация и слипание изолированных синаптических пузырьков мозга протекают в присутствии Ca^{2+} (1—10 мкМ), Mg-АТФ (1 мМ) и СаМ (1—10 мкМ). В отсутствие двух последних факторов ионы Са вызывают агрегацию синаптических пузырьков лишь в миллимолярных концентрациях. При оптимальных условиях наблюдается также Са-зависимое фосфорилирование двух белков мембран синаптических пузырьков при участии везикулярной протеинкиназы и высвобождение медиаторов в среду инкубации. Не ясно, протекает ли последнее благодаря фосфорилированию и изменению конформации мембран либо за счет агрегации, слипания синаптических пузырьков, а значит, и высвобождения части содержимого органелл. Недавно показано, что на внешней поверхности мембран секреторных гранул действительно находятся белки, связывающиеся с кальмодулином.

Вышеперечисленные опыты «страдали» одним недостатком, в них процесс секреции моделировался за счет гомологичного межмембранного взаимодействия, хотя и запускался внешними факторами — Са-связывающими белками. При взаимодействии изолированных хромаффинных гранул надпочечников с микросомами этих же клеток или изолированных синаптических пузырьков мозга с фракцией синаптических мембран (или фракцией синаптических контактов) показано, что в присутствии Ca^{2+} (1—5 мкМ), Mg-АТФ и кальмодулина наблюдается образование гетерологичного контакта (о чем судили по электронно-микроскопическим исследованиям или методом седиментации); Са-зависимое фосфорилирование белков мембран органелл, а также белков плазмалеммы; Са-зависимая секреция медиаторов и их спутников в среду инкубации. Так, модельные исследования по изучению экзоцитоза *in vitro* подтвердили факты об индукторах секреции. Быстрое связывание в присутствии Ca^{2+} белка кальмодулина с синаптическими пузырьками может служить триггером их слияния с плазмалеммой при экзоцитозе.

Пятая стадия экзоцитоза — прекращение возбуждения, реполяризация мембран. По времени она совпадает с концом четвертой стадии — латеральной диффузией мембранного материала секреторных гранул из района экзоцитоза в плазмалемме для подготовки стыкочного центра к контакту со следующей секреторной гранулой. Этот процесс совпадает по времени с началом рециклизации плазмалеммы и самих секреторных гранул. Прекращение экзоцитоза, т. е. реполяризация мембран, инициируется как запаздывающим выходом K^+ по потенциалзависимому К-каналу, так и накоплением Ca^{2+} в цитоплазме до критического уровня. Ионы Са включают функционирование Са-насоса и переносчика в системе Na/Ca-обмена, т. е. запускают системы выхода самих же себя из клетки. В этот период происходят диссоциация актомиозинового комплекса, изменения в других цитоскелетных структурах.

Общая теория слипания и слияния мембран

4

Слипание и слияние мембран — универсальный и нормальный процесс, важная стадия гетерологического и гомологического межмембранного взаимодействия в ходе эндоцитоза и экзоцитоза; оплодотворения клеток, митоза; дифференцировки тканей, например, при биогенезе мышечных волокон; при обмене информационными макромолекулами между клетками; в процессе приобретения клетками новых антигенных свойств; в ходе аутоиммунных реакций (например, при слиянии макрофагов с лимфоцитами); при липосомной химиотерапии; при секреции ядерного содержимого в цитоплазму; при слиянии макрофагов во время воспаления тканей.

Механизмы слияния клеточных и модельных (искусственных) мембран включают в себя одни и те же стадии, что указывает на универсальный механизм взаимодействия мембран. Эти же механизмы распространяются и на слияние мембран внутриклеточных органелл, везикул с плазмалеммой, где важно учитывать специфические подготовительные стадии, ведущие к слиянию. Так, механизмы слияния в системах клетка — клетка, клетка — везикула (чаще всего, секреторные гранулы), везикула — везикула, везикула — плазмалемма, везикула — плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ), БЛМ—БЛМ. Слияние, вероятно, происходит только в специфических участках липидного бислоя мембран. При сближении мембран возникающий скачок потенциала может инициировать образование промежуточных структур (дестабилизация мембраны), необходимых для процесса слияния. Основным эндогенным фактором слияния — ионы Ca^{2+} — резко снижает гидратационный барьер при слиянии мембран. Кроме того, ионы Ca^{2+} снижают (или нейтрализуют) отрицательный поверхностный заряд, непосредственно модифицируют структуру липидного бислоя, вызывают разделение фаз липидов в бислоях, дестабилизируя их; создают кальциевые мостики между двумя контактирующими мембранами, индуцируя слияние.

На моделях клетка — клетка, везикула — везикула, везику-

ла—БЛМ, БЛМ—БЛМ показано, что ионы Са более эффективны, чем ионы Mg, хотя и их эффект проявляется в миллимолярных концентрациях. Пороговая концентрация Ca^{2+} существенно снижается в присутствии Mg^{2+} . Слияние миобластов зависит исключительно от Ca^{2+} , но не от Mg^{2+} , который ингибирует Са-индуцируемое слияние. Замена Ca^{2+} на Zn^{2+} или Mn^{2+} вызывает агрегацию, но не слияние эритроцитов. Ионы Mg в липосомах чаще всего вызывают агрегацию, но не слияние. Са-индуцируемое слияние клеток сопровождается их набуханием. Для получения оптимальных эффектов слияния необходимо присутствие в мембранах кислых липидов, которые при физиологических значениях pH остаются заряженными. Липосомы из фосфатидилинозита под действием Ca^{2+} (1 мМ) не сливаются, а только агрегируют. Однако липосомы из фосфатидной кислоты хорошо подвергаются Са-индуцируемой агрегации и слиянию. Полагают, что при экзцитозе в плазмалемме может происходить ферментативное превращение фосфатидилинозита в фосфатидную кислоту. Липосомы, не имеющие поверхностный заряд, фагоцитируются, тогда как липосомы, состоящие из заряженных липидов, сливаются с плазмалеммой. Возможно, что фагоцитоз инициируется сорбцией липосом независимо от их заряда, но завершается лишь при задержке слияния.

Липосомы из нейтрального липида фосфатидилхолина не сливаются. Наличие в мембранах наряду с кислыми липидами лецитина увеличивает необходимую для слияния концентрацию двухвалентных катионов и уменьшает скорость этого процесса.

Свойствами факторов слияния обладают липиды (фосфатидилэтаноламин, кардиолипин), имеющие форму обратного клина. Клиновидность проявляется в том, что эти липиды в системах липид — вода образуют гексагональную фазу. Чем больше кривизна контактирующих мембран, тем быстрее они сливаются. Маленькие везикулы лучше сливаются друг с другом, чем большие. Полярные амфифильные молекулы (ненасыщенные жирные кислоты, моноацилглицерин), поликатионы (полилизин), углеводороды (декан), продукты перекисного окисления липидов, диметилсульфоксид являются *индукторами слияния*. Уменьшение микровязкости мембран данными факторами слияния способствует взаимодействию клеток.

Процессы слияния предваряются агрегацией везикул, слипанием (адгезией) мембран. Процессам слияния сопутствуют высвобождение содержимого везикул в наружный раствор, иногда тепловыделение, дестабилизация мембран: образование кохлеарных структур, появление обратных мицелл, содержащих «колические» липиды. Лимитирующей по времени стадией является агрегация везикул, а сам акт слияния происходит очень быстро. Фазовый переход — необходимый этап в процессе слияния мембран. Процесс высвобождения, утечки содержимого из везикул заметно отделен во времени от слияния, при этом в модель-

ных экспериментах их везикул высвобождается небольшая ($\leq 5-10\%$) часть содержимого.

Сам акт слияния включает несколько стадий: частичное (полуслияние) и полное слияние, сопровождающееся на последних этапах стабилизацией переходных структур, появлением особых *кохлеарных внутримембранных частиц* и самое главное, объединением внутренних объемов клеток или везикул. Снижение плотности поверхностного заряда, увеличение ионной концентрации среды, снижение рН среды и введение поликатионов способствует сближению и контакту мембран. Повышение вязкости среды мешает сближению, но облегчает образование контакта уже сближенных мембран. *Деформация клеточной поверхности* — важный фактор слипания и слияния мембран.

При рассмотрении экзоцитоза (см. разд. 3.5) было указано на определяющую роль в секреторном процессе устройства состыковочного центра плазмалеммы при его контакте с мембраной секреторных гранул. Выступы в плазмалемме, обращенные в цитоплазму, при экзоцитозе должны иметь значительно меньший радиус кривизны, чем секреторная гранула. При контакте сперматозоида с яйцеклеткой их слияние облегчается микроворсинками. Первоначальное сцепление мембран на малой площади распространяется далее на большую площадь.

Сближение мембран до критического расстояния (≤ 2 нм, когда уже произошел непосредственный контакт) приводит к агрегации и латеральной диффузии белков из области контакта, т. е. в зоне слипания контактируют безбелковые липидные домены, бислои мембран (рис. 13). Белки в случае экзоцитоза (см. разд. 3.5) могут удаляться в сторону состыковочного центра (и даже за его пределы) и, кроме того, преформировать пункты удерживания мембран в этом центре. Белки могут удаляться активным путем с затратой энергии, например, при функционировании спектрин-актиновой сети; и пассивным способом за счет геометрической асимметрии молекул белка и отличия кривизны мембраны в различных ее участках, а также за счет перемещения полярных белков при электростатическом взаимодействии сблизившихся мембран.

В зоне контакта происходит практически полная дегидратация мембран. Двухвалентные катионы способны дегидратировать полярные головки липидов. Известно, что полиэтиленгликоль индуцирует слияние различных везикул, а декстран — лишь агрегацию, но не слияние. Оба реагента связывают структурированную воду у поверхности бислоев. В отличие от декстрана, полиэтиленгликоль вызывает структурные дефекты в липидном бислое.

Плотный контакт обеих мембран сначала приводит к образованию *пенталаминарной*, а затем *триламинарной* структуры (диафрагмы). Последняя образуется после постепенного вытеснения двух лишних слоев мембран на периферию области контакта. Триламинарная структура — это новый одинарный би-

слой в зоне контакта, образованный из двух сблизившихся и контактирующих бислоев. Образование триламнарной структуры — универсальный процесс межмембранного взаимодействия. Гидрофильная поверхность триламнарной структуры не является результатом взаимопроникновения двух бислоев.

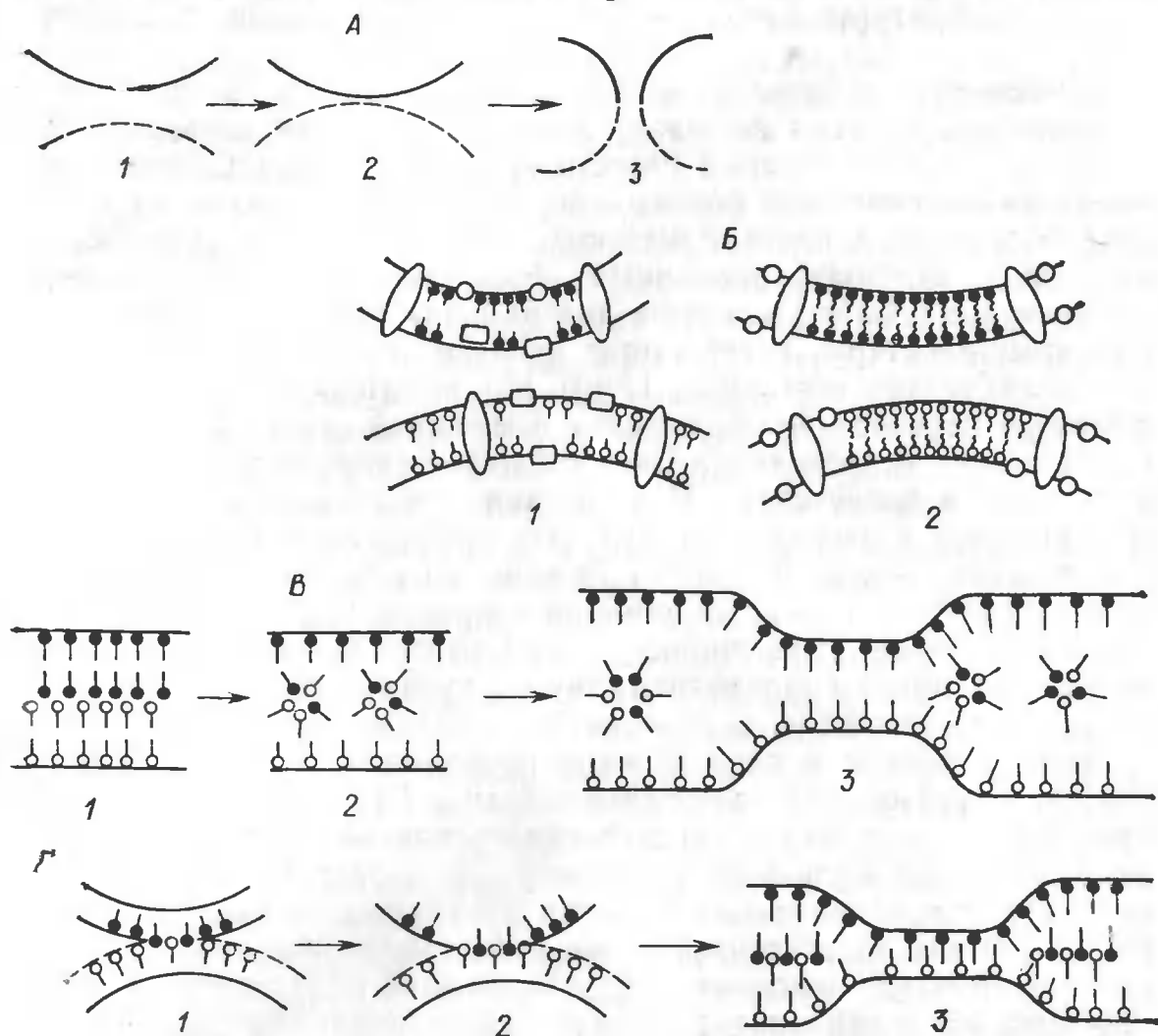


Рис. 13. Механизмы Са-зависимого слияния мембран (А — Г):

А: 1 — до слияния, 2 — частичное слияние (полуслияние) с образованием триламнарной структуры, 3 — полное слияние и образование «пор»; Б: 1 — до слияния, 2 — готовность к слиянию (наблюдается агрегация внутримембранных белковых глобул, их латеральная диффузия из зоны слияния, липидная фаза становится более жидкой, за счет дестабилизации мембраны в липидном бислое образуются кластеры — мицеллярные глобулы в кристаллическом состоянии); В: 1 — пенталаминарная структура, 2 — первичный акт слияния, образование мицелл, 3 — образование триламнарной структуры; Г: 1 — образование зоны контакта, 2 — ее увеличение, 3 — кристаллизация липидных бислоев. При переходе от 2 к 3 (ВГ) — разрыв внешних слоев контактирующих мембран, частичное удаление материала из области контакта

Са-Зависимая дестабилизация структуры мембран при их контакте друг с другом приводит к тому, что в липидных доменах пенталаминарной структуры, большая часть которых находится в жидком состоянии, появляются кластеры из мицеллярных глобул в кристаллическом состоянии (рис. 13). Границы кластеров дестабилизируют бислои.

Для слияния требуется, чтобы липидные бислои в зоне кон-

такта мембран находились в более подвижном, жидком состоянии. Например, липиды мембран сперматозоидов по мере созревания становятся более жидкими. Холестерин снижает подвижность липидных молекул и тормозит слияние. Липосомы стимулируют слияние клеток только при температуре около или выше температуры фазового перехода составляющих их липидов.

Добавление ионов Ca в малой концентрации в суспензию мембранных везикул вызывает агрегацию, но не слияние последних. При достижении пороговой концентрации Ca^{2+} происходит изотермический фазовый переход фосфолипидов из жидкого состояния в кристаллическое и индуцируется слияние. В везикулах из смеси различных фосфолипидов надпороговые концентрации Ca^{2+} вызывают латеральное разделение липидов, при этом кластеры, содержащие кислые липиды, переходят в кристаллическое состояние. Ионы Mg повышают температуру фазового перехода фосфолипидов в меньшей степени, чем Ca^{2+} . Отсюда следует, что когда Ca^{2+} вызывает слияние везикул, фосфолипиды в присутствии Mg^{2+} остаются в жидком состоянии и наблюдается агрегация везикул. Эти опыты указывают на то, что дестабилизация бислоев при слиянии обусловлена образованием кластеров твердых липидов в жидком бислое.

Структурные перестройки и образование триламинарной структуры могут происходить двумя путями: локально, в зоне «точечного» контакта, в этом случае образуется *сталк* (перемычка); в зоне плотного дегидратированного контакта (адгезия) на значительной площади мембраны. *Сталкерный механизм* предусматривает, что в зоне точечного контакта присутствуют асимметричные молекулы липидов, участки нестабильности. При контакте эти молекулы хаотически двигаются до тех пор, пока не образуется энергетически выгодная триламинарная структура. *Адгезионный механизм* предусматривает образование в зоне контакта обратных мицелл, сходных гексагональной фазе, в зоне контакта нарушается устойчивость плоской упаковки монослоев, последние преобразуются на обратные мицеллы, которые затем удаляются на периферию зоны контакта (см. рис. 13). Движущей силой слияния мембран, т. е. «распада» триламинарной структуры, в первом случае является упругость изгиба, во втором — упругость растяжения и сжатия монослоев. Во втором случае переход из жидкого в кристаллическое состояние сопровождается уменьшением площади, приходящейся на одну молекулу, что соответствует конденсации молекул. Дестабилизация мембраны в обоих вариантах слипания может вызываться «транс»-комплексом одного иона Ca с двумя молекулами кислого фосфолипида, принадлежащими контактирующим мембранам.

Головки липидных молекул сильно притягиваются друг к другу в условиях дегидратированного контакта мембран; в зоне контакта происходит «кристаллизация» молекул. Мембраны,

полярные группы которых образуют решетку чередующихся зарядов, электрически притягиваются друг к другу. Внутренние объемы двух контактирующих мембранных структур в случае монослойного слияния, т. е. образования триламнарной структуры, разделены не двумя, а лишь одним бислоем (см. рис. 13). Первичная кристаллизация действует далее как застезка «молния», пристегивающая соседние контактирующие участки мембран. Триламнарная структура разрывается за счет избытка площади внутренних монослоев и искажения формы контактирующих мембранных структур или на поздних этапах «застегивания молнии».

При сталкерном механизме слияния мембран сталк может образоваться как из одного монослоя, так и из целого бислоя; в первом случае формируется промежуточная триламнарная структура, во втором — перемычка сразу же ведет к полному слиянию. Сталк возникает за счет локальных «вспучиваний» (выростов) некоторых участков (монослоев) контактирующих мембран, растущих навстречу друг другу. Эти выросты либо замыкаются друг на друга, либо замыкаются через немембранные цитозольные липидные мицеллы. Возможной причиной быстрого разрушения сталка в физиологических условиях является электрический пробой сильным внутримембранным полем в области контакта мембран.

Триламнарная структура имеет ряд особенностей: специфическая удельная электрическая емкость, электромеханическая стабильность, высокая ионная проницаемость. В области контакта в липидных доменах возникает либо локальная разупорядоченность структур, при которой молекулы липидов ориентированы хаотично, либо, что более вероятно, образуется лабильная триламнарная структура. Затем как в первом, так и во втором случае раньше, чем произойдет восстановление нативной мембранной структуры, липидные молекулы в зоне контакта образуют своеобразные мостики между слоями, при этом образуется открытый водный канал (пора). Пора растет в размерах. Из-за высокой поверхностной кривизны в поре образованные структуры неустойчивы, мембраны разделяются.

Следует еще раз подчеркнуть, что Са-индуцируемое фазовое разделение фосфолипидов при слиянии происходит либо в бислое, либо только в наружном монослое мембранных везикул. Это может привести к образованию дефектов структуры бислоев и к прямому контакту гидрофобных хвостов фосфолипидов с водной фазой. Нестабильность таких участков способствует слиянию везикул на этих участках. Центры нестабильности локализуются на границах твердых доменов (мицелл) в жидком бислое. Слияние индуцируется либо за счет взаимодействия липидных мицелл, либо за счет локальных изгибов бислоев, либо за счет электрического пробоя бислоев.

Можно рассмотреть вариант нефизиологической секреции ацетилхолина нервно-мышечными синапсами, препараты кото-

рых инкубировали в среде, содержащей 90—110 мМ CaCl_2 (или MgCl_2). В этом случае в терминалях наблюдается скопление, агглютинация, сотообразование синаптических пузырьков возле пресинаптической мембраны и, наконец, дегенерация нервных окончаний. В синаптоплазме накапливается очень высокая концентрация ионов Ca , которые индуцируют агрегацию синаптических пузырьков, при этом медиатор части слипшихся синаптических пузырьков высвобождается в цитоплазму и далее происходит нефизиологическая, невезикулярная секреция.

В нормальных условиях слипание и слияние клеток происходит сравнительно редко (в зависимости от функционального состояния клеток). В связи с практическими проблемами соматической гибридизации клеток, реконструкции клеток (слияние кариопласта с цитопластом), получения гибридом из лимфоцитов и клеток миеломы для выработки моноклональных антител необходимо создание универсальных методов слияния клеток и органелл *in vitro*. Используемые индукторы слияния на фоне Ca^{2+} (1—10 мМ) клеток животных — вирус Сендай (в оболочке которого присутствует нейраминидаза), клеток растительных протопластов — полиэтиленгликоль — приводят к низкому выходу гибридных клеток. В 1979 г. был разработан универсальный метод слияния любых клеток (в суспензии) — *метод электрического пробоя*. Этот метод основан на резком увеличении проводимости и проницаемости мембран в сильном электрическом поле (40 мкс, 4—6 кВ/см). При этом среди способов приведения клеток в контакт перед электростимуляцией используют *диэлектрофорез* — перемещение клеток в неоднородном переменном электрическом поле в растворе диэлектрика в сторону увеличения напряженности (в этом случае формируется большое число контактирующих друг с другом параллельных цепочек клеток). Увеличение образования гибридных клеток (химер) или гигантских клеток описанным способом достигается ферментативной обработкой клеток до слипания и слияния, главным образом направленной на удаление гликокаликса.

Заключение

Несмотря на то что феномен фагоцитоза описан сравнительно давно, в его механизме есть много неясного, а полнота описания биохимических и биофизических процессов явно не достигла целостности и законченности. Выяснено многое: роль гликокаликса плазмалеммы в эндоцитозе; значение цитоскелетных сократительных структур для инвагинации плазмалеммы и образования эндосом; трансформация захваченных веществ при участии системы ГЭРЛ; рециклизация рецепторов и репарация плазмалеммы после утраты ее части в ходе эндоцитоза; вовлечение эндоцитоза в межклеточный и внутриклеточный транспорт информационных молекул. Тем не менее единой «концепции цитоза» не существует.

В то же время становится все более ясным, что для понимания многих процессов жизнедеятельности клеток, регуляции биохимических процессов в мембранах следует рассматривать эндо- и экзоцитоз в интегральном, целостном виде, поскольку механизмы обоих процессов имеют много общего. Изучение эндо- и экзоцитоза выявляет универсальность этих процессов практически во всех клетках. Все это требует сочетания различных методов исследования в разработке комплексного подхода к изучению конкретных механизмов и специфики регуляции эндо- и экзоцитоза.

При рассмотрении эндо- и экзоцитоза необходимо учитывать обеспечение обоих процессов кислыми компартментами клетки: эндосомы, одетые везикулы, секреторные гранулы, лизосомы, формирующиеся из цистерн аппарата Гольджи. Особенностью этих везикулярных компартментов является наличие в их мембранах малоизученного H-насоса немитохондриального типа. Рассмотрение специфического эндоцитоза, открытого в последние годы, уже сейчас обогатило исследователей принципиально новой информацией, а самое главное, уже сейчас многое дало для понимания природы патологических процессов. Проясняется судьба поглощенных клеткой различных лигандов — от физиологически активных веществ до «токсических» частиц и соединений, проясняется роль специфической ассоциации рецепторов в плазмалемме и их рециклизации.

Рекомендуемая литература

- Биологическая химия*. Т. 17//Итоги науки и техники. М., 1982.
- Биохимия мембран*/Под ред. А. А. Болдырева. Кн. 4. А. Я. Кульберг. Рецепторы клеточных мембран. М., 1987.
- Булычев А. Г.* Сегрегационная функция клетки и ее молекулярные механизмы//Цитология. 1986. Т. 28. № 4. С. 387—402.
- Взаимодействие и слияние мембран*//Итоги науки и техники/Биофизика мембран. Т. 3. М., 1984.
- Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Функциональная биохимия синапсов. М., 1978.
- Дин Р.* Процессы распада к клетке. М., 1981.
- Салеев Р. К., Романенко А. С.* Эндоцитоз. Новосибирск, 1979.
- Ультраструктура нейрона (транспортные процессы)*//Итоги науки и техники/Морфология человека и животных. Антропология. Т. 10. М., 1983.
- Финеан Д., Колман Р., Мичелл Р.* Мембраны и их функции в клетке. М., 1977.
- Шубникова Е. А., Коротко Г. Ф.* Секреция желез. М., 1986.
- Wileman T., Harding C., Fthahl Ph.* Receptor-mediated endocytosis // Biochem. J. 1985. V. 232. P. 1—14.

Предметный указатель

- Апо-белок 40
Апотрансферрин 52
АТФаза 24, 77
— «раздевающая» 46
Н-АТФаза С.м. Н-Насос
Na, K-АТФаза 29, 75
Аутофагия 18
Ацетилхолинэстераза 33
Ацидотропные вещества 20, 46, 53, 66*
- Вакуоль эндоцитозная 16, 17*—24, 26*, 31, 51, 52
Везикулы гладкие 44, 47, 53
— одетые 9*, 16*, 20, 32, 35, 44, 45
— — особые функции 53
— — трансформация 47, 48*
Везикуляризация 9*, 11, 16, 25
Вителлогенин 37, 38*
Внутримембранные частицы белковые 79, 81, 82
- Гетерофагия 18
Гиперхолестеринемия 40
Гипотеза сигнальная 68
Гликокаликс 11, 12*, 14, 21, 25, 29, 71, 90, 91
Глия 7, 32, 34—36
- ДНК, эндоцитоз 18
— межтканевый транспорт генетического материала 33
— новый способ репарации 34
- Иммуноглобулины 15, 32, 37, 39*, 41, 42, 49, 54, 59
Инвагинация 11, 17*, 22, 24—26, 34, 43, 47
Интернализация 11, 20, 23, 27, 41, 42, 47, 49
— рецепторов 38*, 39*, 43—45
Ионные каналы 74*, 75, 83
Ионы кальция 11, 15, 16, 21, 24, 25, 46, 50, 59, 64*, 67, 72—76, 79, 80, 82—90
- Кавеолы 17*, 41
Кальмодулин 74*, 76, 77, 83
Кластеризация рецепторов 23, 42—45, 54
Кластеры 42*, 54
Клатрин 10*, 43, 45, 53, 54, 56
Колпачки 42*, 54
Колхицин 19, 22, 24, 42
Конкавалин А 10*, 13, 15, 42, 47
Контакты межклеточные 34
— щелевидные 34*, 71
- α -Латротоксин 59
Лейкоциты 16, 18, 19, 22, 23, 26, 38*, 39*, 70, 72
Лизосомные болезни 18, 20
Лизосомы 15—20, 27—31, 38*, 41, 50—53, 59, 71
Лимфокины 15
Липиды 23, 25, 26, 82, 85, 88—90
Липовителлин 37, 38*
Липопroteины низкой плотности 38*, 40, 43, 45, 50, 52
- Макрофаги 7, 12, 13, 15, 16, 19, 20, 24, 26—28, 30, 42, 43, 49, 70—72, 84
Макроэндоцитоз 22, 24
Межклеточный обмен информационными макромолекулами 6, 18, 19, 56
— транспорт веществ 19, 31—35
Межмембранное взаимодействие 6, 14
Мембраны бислойные липидные (БЛМ) 84
— индукторы слияния 85
— Са-зависимые 87*
— контактный участок 8
— слипание и слияние 84
Микроворсинки 21
Микропиноцитоз 26
Микротрубочки 18, 24, 54, 77, 80*
Микрофагоцитоз 34
Микрофиламенты 24, 77, 80*
Микрошипы 21, 22
- Н-Насос 20, 46, 52, 67
Нуклеосомы 60

* Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки или таблицы.

Окаймленные ямки плазмалеммы 43,
44, 46—48, 50
Опсоины 14
Органелла *CURL* 48*, 51, 52, 57

Перекисное окисление липидов 22, 26,
85

Пероксидаза 12, 13, 28, 30—33, 59

Пиносомы 9*, 11

Пиноцитоз 6, 7, 8*, 13, 14

— абсорбционный 9*, 10*, 12, 14, 22,
24

— жидкофазный 9*, 10*, 12, 24, 43,
48

— индукторы 24

Плазмалемма 7, 13—15, 26, 28, 29

— форма распределения рецепторов
и антигенов 42*

Прелизосомы 19

Псевдоподии 8*, 14, 21, 22, 24, 29,
36, 61

Пятчи 42*, 54

Рецептосомы *См.* Везикулы гладкие

Рециклизация мембран 6, 17*, 26—31,
49, 50

— пути 27*, 29

— рецепторов 6, 47, 48*

— секреторных гранул 56—59

Секреторные клетки, свойства 63

Секреция апокриновая 60

— аутокринная 62

— везикулярная 63*

— голокриновая 61

— гормональная, системы 62

— мерокриновая 60, 64

— невезикулярная 63*

— паракринная 62

— по типу экзоцитоза 66*

— спутников 66, 67*

— сывороточных белков печени 71

— тиреоидного гормона 72

— эволюция процессов 70

— ферментов и белков 70

Сигналаза 68

Синаптогенез 55, 56

Синексин 82

Синтез секреторных белков 6, 68—70

Система ГЭРЛ 16*, 19, 26

Состыковочный центр 78

Спектрин 79, 80, 86

Спинулы 34*, 35, 56

Тафцин 41

Токсины 7, 9*, 41, 50, 53

Транспорт контейнерный 6

Трансферрин 38*, 41—43

Трансцитоз 31, 32, 56

Триламнарная структура 86

— — адгезионный механизм 88

— — сталкерный механизм 88

Трискелионы 45

Фагосома 9*

Фагоцитоз 6—8*, 9*, 13, 35, 43

— активный 15

— механо-химическая схема 23*

— пассивный 15

— этапы основные 14

Ферритин 12, 13, 24, 32

Ферротрансферрин 52

Фибробласты 13, 14, 26—28, 30, 38—
40, 43, 45, 50

Холестерин 23, 26, 40, 41, 47, 52, 88

Циклические нуклеотиды 18, 34, 54,
64*, 72, 73

Цитоз 7

Цитоскелет 6, 10*, 11, 23, 24, 42, 43,
47, 51, 54, 77

Цитостатики 24

Цитохалазин В 19, 24, 42

Экзоцитоз, альтернативные вариан-
ты 81

— механо-химическая концепция 76

— механизмы 73, 80*

— после эндоцитоза 31, 72

— различных веществ 61*

— секреторный цикл 65*

— типы секреции 60

Эктоплазма 11, 12*, 22, 23

Эндоплазма 12*

Эндосомы 9, 11, 17, 25, 32, 47

Эндотелий 32, 41

Эндоцитоз, активный транспорт ве-
ществ 22

— гипотеза контрактильная 23

— — механо-химическая 23

— защитная функция 20

— индукторы 13

— механизмы 21

— неспецифический 8, 17*, 48

— обратный 60

— первичный акт 13

— после экзоцитоза 19, 27, 31, 55,
56*, 59, 82

— рецептор-индуцируемый 6, 7, 37

— специфический 7, 8*, 9*, 44, 47

— — феноменология 37

— — характеристики 38*

— типы 8*

— трансформация материала 16, 17*

— фазы 21

— характеристики 9*

Эндоцитозные каналы удлиненные 11

Эпителий 7, 12—14, 19, 22, 26, 32, 52,
54, 71, 72

Оглавление

Предисловие	5
Введение	6
Глава 1. Неспецифический эндоцитоз (пиноцитоз и фагоцитоз) . .	7
1.1. Общая характеристика	7
1.2. Индукторы эндоцитоза	13
1.3. Трансформация эндоцитозного материала	16
1.4. Механизмы эндоцитоза	21
1.5. Рециклизация мембран	26
1.6. Трансцитоз (межклеточный транспорт веществ)	31
1.7. Эндоцитоз и межклеточные контакты	34
Глава 2. Специфический или рецептор-индуцируемый эндоцитоз . .	37
2.1. Феноменология специфического эндоцитоза	37
2.2. Интернализация рецепторов	43
2.3. Свойства одетых везикул. Клатрин	45
2.4. Трансформация одетых везикул. Рециклизация рецепторов	47
2.5. Особые функции одетых везикул	53
2.6. Феномен увеличения эндоцитоза после экзоцитоза	55
Глава 3. Экзоцитоз	60
3.1. Типы секреции веществ	60
3.2. Свойства секреторных клеток	63
3.3. Сигнальная гипотеза	68
3.4. Секреция ферментов и белков	70
3.5. Механизмы экзоцитоза	73
Глава 4. Общая теория слипания и слияния мембран	84
Заключение	91
Рекомендуемая литература	92
Предметный указатель	93

Учебное издание

Рудольф Николаевич Глебов

Эндоцитоз и экзоцитоз

Зав. редакцией А. Г. Гаврилов. Редактор А. С. Орлова. Мл. редактор И. М. Павлова. Художественный редактор Т. А. Коленкова. Художник В. Н. Хомяков. Технический редактор Т. Н. Полунина. Корректор С. К. Завьялова.

ИБ № 6441

Изд. № Е—530. Сдано в набор 26.02.87. Подп. в печать 05.06.87. Т—10186.
Формат 60×90^{1/16}. Бум. тип. № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая.
Объем 6,0 усл. печ. л. 6,25 усл. кр.-отт. 6,22 уч. изд. л. Тираж 8700 экз. Зак. № 1040.
Цена 20 коп.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.

Московская типография № 8 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 101898, Москва, Центр, Хохловский пер., 7.

20 коп.

БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Книга продолжает серию учебных пособий по современным проблемам биохимии мембран и дает основные сведения о молекулярных механизмах эндоцитоза и экзоцитоза.

