

LP.3 Tehnici de evaluare structurală și funcțională a organelor celulare.

Citoplasma este formată din două compartimente:

1. Citoplasma nestructurată sau hialoplasma (substanța fundamentală a citoplasmei),
2. Citoplasma structurată sau morfoplasma, reprezentată de organele celulare.

În afară organelor celulare, în citoplasmă se pot găsi incluziuni celulare, produși de secreție și acumulări ale unor produși exogeni.

Clasificarea organelor celulare după funcția lor în celulă:

A. Organele sintezei și secreției celulare:

- reticulul endoplasmic,
- ribozomii,
- complexul Golgi.

D. Organele motilității celulare:

- microfilamentele,
- microtubulii,
- centrozomul.

B. Organele generatoare de energie:

- mitocondriile.

E. Incluziuni celulare

- substanțe proteice, de exemplu hemoglobina;
- lipide, sub formă de picături sferice
- glicogen-
- substanțele minerale - fier, siliciu

C. Organele digestiei celulare:

- lizozomii,
- peroxizomii.

A. ORGANITELE SINTEZEI SI SECRETIEI CELULARE:

1. RETICULUL ENDOPLASMIC

Definiție	Este un organit membranar, reprezentat de o rețea interconectată de canalicule, vezicule și cisterne delimitate de endomembrane (bistrat fosfolipidic) cu o grosime de 5-6 nm.	
Localizare	Comun tuturor celulelor cu excepția hematiei adulte	
Număr	Este prezent în număr mare în celulele angajate în sinteze de proteine, glucide și lipide, fiind bine dezvoltat în celulele secretoarei exo- și endocrine.	
Tipuri:	- RE neted	- RE rugos (granular)
Reprezentare in celule	REN este bine reprezentat în celulele care sintetizează hormoni steroizi (glanda suprarenală, celulele interstițiale din testicul și ovar), glicogen (hepatocite) și pigmenți (melanocite).	RER este bine reprezentat în celulele glandulare (pancreatice), în hepatocite (unde formează corpii Berg), în celulele nervoase (unde formează corpii lui Nissl).
Forma , dimensiuni	Este un sistem de canalicule și cisterne delimitate de endomembrane.	Este un ansamblu de structuri canaliculare și veziculare membranare, cu diametru de aproximativ 20 nm, pe suprafața cărora se găsesc atașați ribozomi, prin subunitatea mare și care sintetizează proteine de export.
Organizare structurala -MO	Nu este vizibil la microscopul fonic.	Este vizibil la microscopul fonic datorită prezenței ribozomilor
Organizare ultrastructurala- ME	Apare ca un labirint de canalicule care comunică cu sacii RER și la nivelul cărora nu se atașează ribozomi. Membranele REN au structură similară RER prezintând fenestrari asemănătoare porilor nucleari.	Apare sub formă de canalicule, saci aplatizați sau vezicule delimitate de endomembrane . Membranele RE se continuă cu membrana externă a învelișului nuclear, iar lumenul, cu cisterna perinucleară. (figurile 1, 2)
Evidențiere	RE poate fi vizualizat folosind colorații histologice specifice, tehnici de imunofluorescență sau microscopie electronică.	

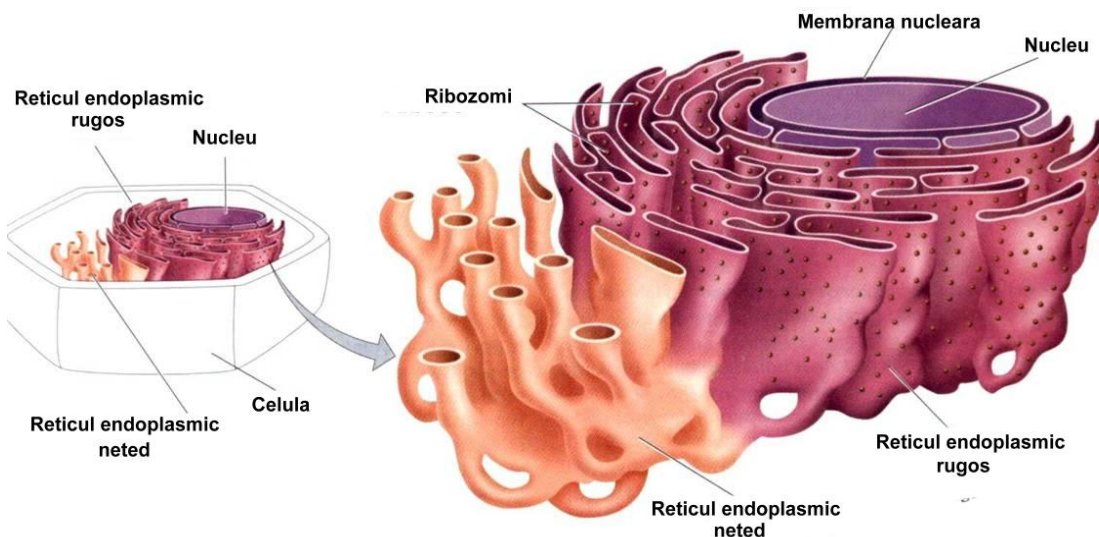


Figura 1. Localizarea RER si REN în celulă în raport cu nucleul.

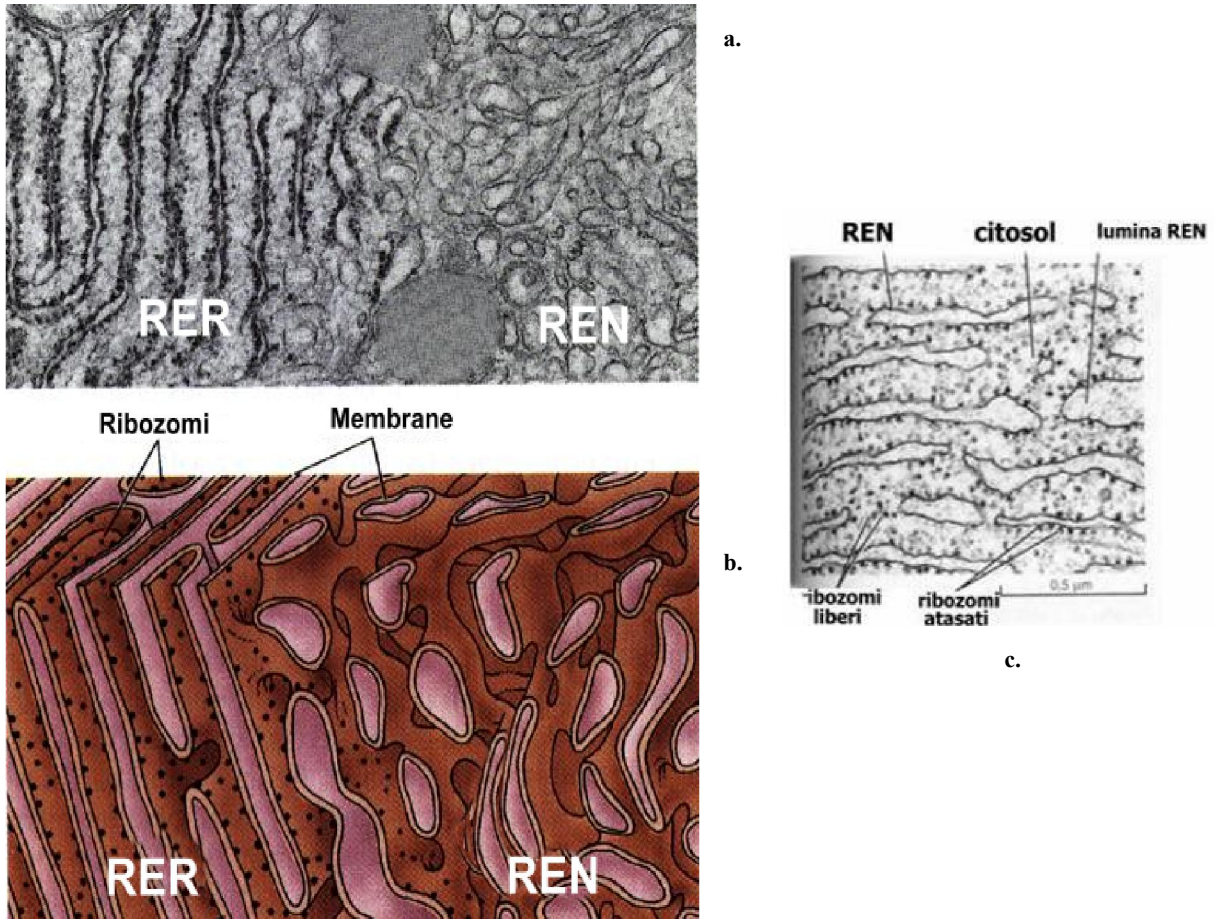


Figura 2. Reticul endoplasmic neted si rugos, schema si ME

2. RIBOZOMII sau corpusculii lui Palade (1953)

Definitie	Ribozomii sunt organite celulare submicroscopice, nemembranare, formate din ribonucleoproteine (proteine si ARNr) având rol în procesele de sinteză a proteinelor.
Localizare	sunt prezenți în citoplasma tuturor celulelor, cu excepția eritrocitelor
Tipuri	Pot fi de două tipuri: - ribozomi liberi în citoplasmă -izolați - grupați în poliribozomi (polizomi) -atașați de membranele reticulului endoplasmic și de fața citoplasmatică a învelișului nuclear
Numar	Numărul ribozomilor variază în funcție de tipul de celulă.

	Astfel, ei se găsesc în număr foarte mare în celulele secretorii angajate în sinteza de proteine.
Dimensiuni	diametrul este cuprins între 15 - 30 nm.
Organizare structurala - MO	ribozomii nu pot fi observați datorită dimensiunilor foarte mici, sub limita puterii de rezoluție. În celulele în care se desfășoară procese intense de proteogeneză (celulele foliculare din ovar), ribozomii formează zone intens bazofile în citoplasmă.
Organizare ultrastructurala- ME	apar sub formă de granule ovalare sau elipsoidale cu diametrul mare de 20-30 nm și diametrul mic de 16-17 nm. Prezintă două subunități inegale ca dimensiune și diferite ca structură morfologică și biochimică, (figura 3, 4). - subunitatea mică, cu coeficient de sedimentare de 40SV; - subunitatea mare de 60SV, prevăzută cu un canal prin care trece lanțul peptidic sintetizat

Figura 3. Poliribozomii. Formarea lanțurilor sinuoase în care ribozomii sunt uniți între ei printr-o moleculă de ARNm care are forma unui filament gros.

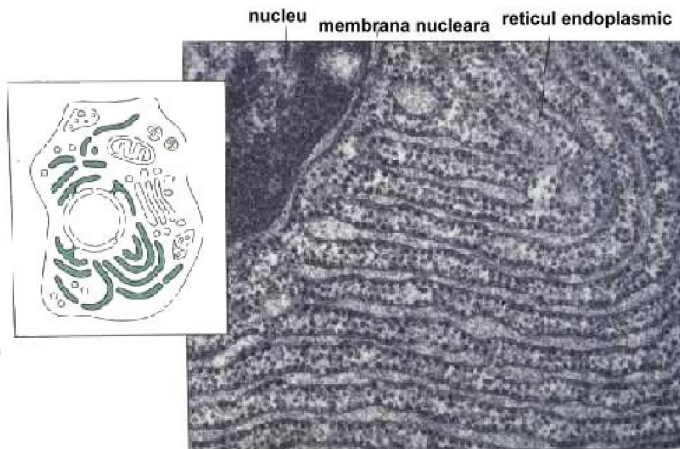
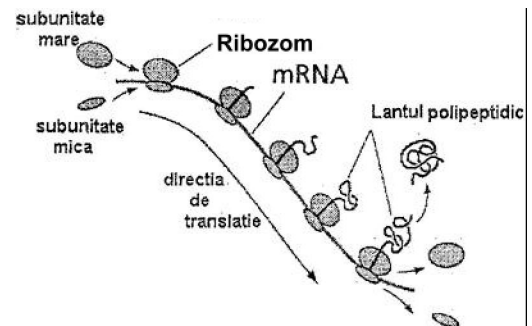


Figura 4. Ribozomi atașati reticulului endoplasmic, ME.

La nivelul poliribozomilor liberi se sintetizează proteinele de structură (proces de diviziune și creștere), iar la nivelul ribozomilor atașati membranelor RE se sintetizează proteine de export (enzime, hormoni, anticorpi).

3. APARATUL GOLGI

Definiție	Este un sistem intracitoplasmatic de cavități limitate de citomembrane,
Localizare	Este prezent atât în celulele vegetale cât și în celulele animale, cu excepția hematiei adulte. Este diferită în funcție de tipul și activitatea celulei - în neuroni este plasat perinuclear, în celulele secretorii exocrine se află supranuclear, iar în celulele tiroidiene se deplasează între cei doi poli ai celulei
Organizare structurala -MO	Rețea de canalicule anastomozate și de vacuole de diferite mărimi, dictiozomi (formațiuni izolate sau grupate sub forma de tubuli anastomozati între ei sau sub forma de cisterne)
Organizare ultrastructurala- ME	« Corpii Golgi » se caracterizează ultrastructural prin : -saci turtiți formați din unitatea membranară , dispuși paralel cu extremitățile mai dilatate ce prezintă o față proximală, de formare, orientată către nucleu (cis) și o față distală, de maturare, orientată către plasmalemă (trans) (figura 5). -vezicule, situate în laextremitatea sacilor, în raport cu fața de maturare, cu diametrul de 25-50 nm -vacuole de 0,5-1micron situate lângă fața de formare (pe fața concavă) a sacilor paraleli (figurile 6,7,8,9)
Evidențiere	Poate fi evidențiat în celula proaspătă cu colorantul roșu-neutru, iar în celula fixată prin colorare cu saruri de osmiu unde apare ca o rețea filamentoasă anastomozată, situată peri sau paranuclear.

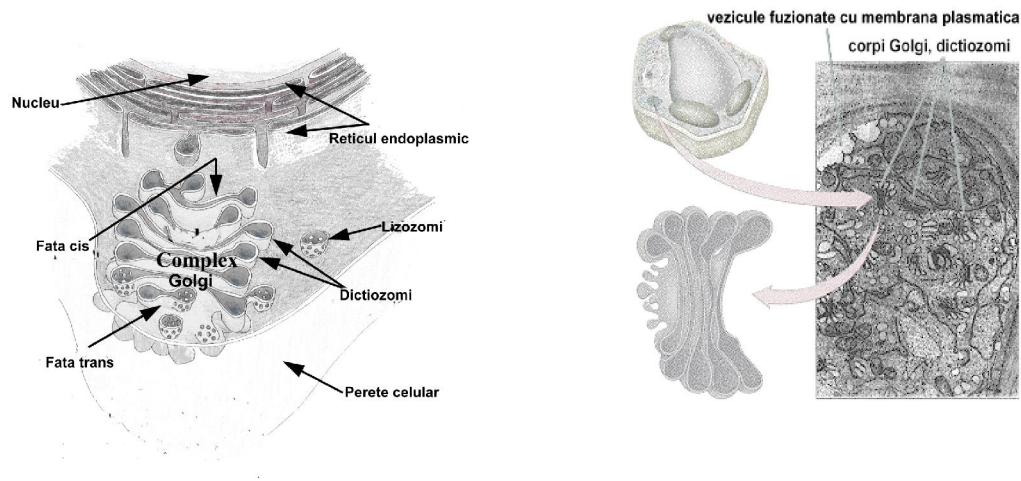
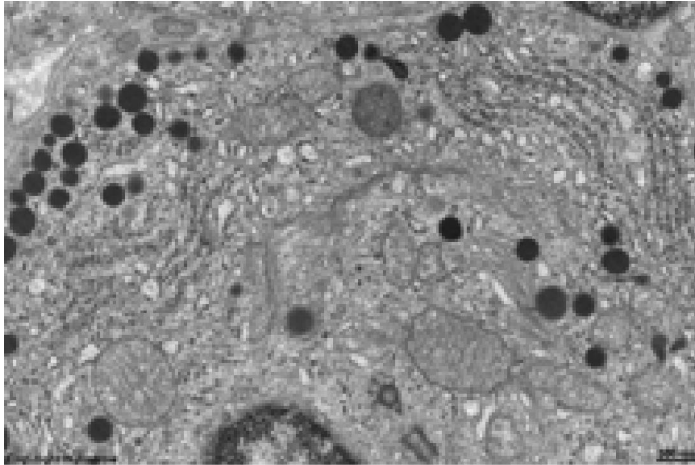


Figura 5. Aparatul Golgi - dictiozomi - formați din cisterne aplatizate și vezicule delimitate de membrane lipoproteice
 Au rol în formarea endomembranelor, sinteza complexelor de hidrați de carbon, formarea proteoglicanilor și a glicoproteinelor, maturarea lipoproteinelor, formarea lizozomilor primari.



APARAT GOLGI

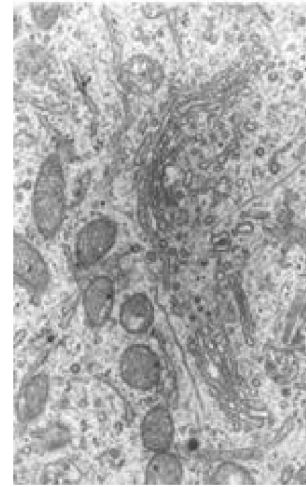


Figura 6. Aparat Golgi, adenohipofiza, ME

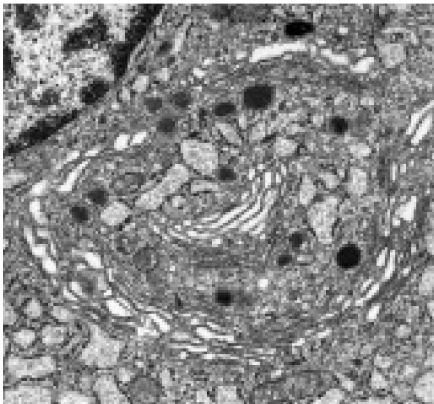


Figura 7. Aparat Golgi, capsula Bowmann rinichi, ME

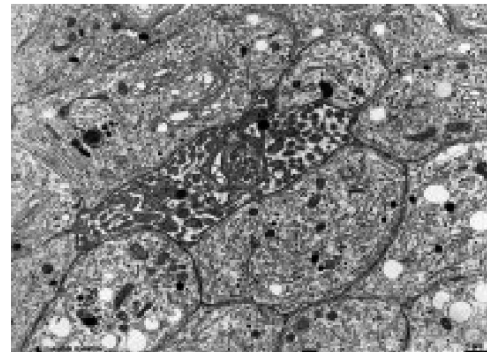
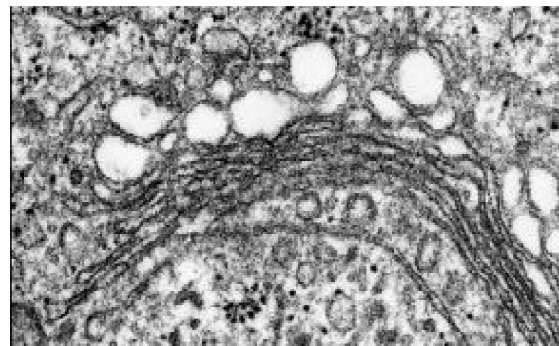


Figura 8. Aparat Golgi, epididim, ME

Figura 9. Aparat Golgi, Limfocit, ME



B. ORGANITELE GENERATOARE DE ENERGIE:

1. MITOCONDRIILE

Definiție	Mitocondriile sunt organite membranare ce conțin sisteme enzimatice necesare oxidării materialelor nutritive, sintezei moleculelor de ATP și cuplarea acestor două procese (fosforilarea oxidativă).
Localizare	Prezente în toate celulele cu metabolism aerob, cu excepția eritrocitului adult. Sunt răspândite în întreaga citoplasmă, cu predilecție la poli celulei sau perinuclear în momentele de intensă activitate de sinteză.
Număr	Depinde de gradul activității celulare, fiind mai numeroase în celulele în care activitatea funcțională este intensă (ex. hepatocite).
Dimensiuni	Lungimea este de aprox. 7μm, iar grosimea de 0,5 μm; cu cât o celulă este mai activă cu atât mitocondriile sunt mai mari.
Forma	- au o mare plasticitate - alungită în celulele pancreasului exocrin - granulară în hepatocite
Organizare structurala -MO	la microscopul fonic în contrast de fază: sub formă de granule izolate în citoplasmă, granule <i>dispuse sub forma unui șirag de mărgel</i> sau filamente, (figura 10).
Organizare ultrastructurala- ME	Formă sferică, formate din două membrane: membrana externă și membrana internă care trimite în interior prelungiri ce formează crestele mitocondriale. Spațiul dintre cele două membrane se numește camera externă, iar între membrana internă și crestele mitocondriale se află camera internă sau matricea mitocondrială. Membrana internă este alcătuită din particule elementare - unitățile tripartite care sunt alcătuite dintr-un cap sferic, o tijă cilindrică și o bază patrulateră (figurile 11, 12, 13)
Evidențiere	Colorații supravitale cu verde Janus B pentru celulele nefixate și hematoxilină ferică Regaud pentru celulele fixate



Figura 10. Structura mitocondriei, schema. 1. Membrana externa, 2. Membrana internă ce trimite în interior prelungiri, 3. Cristele mitocondriale, 4. Matricea mitocondrială



Figura 11. Criste mitocondriale, ME

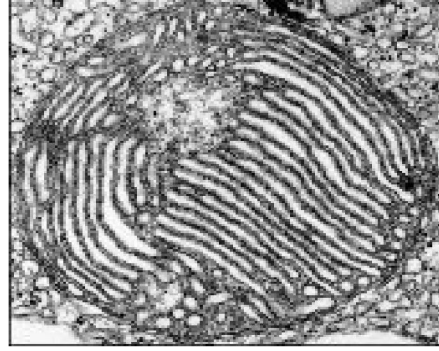


Figura 12. Tubuli mitocondriali, ME

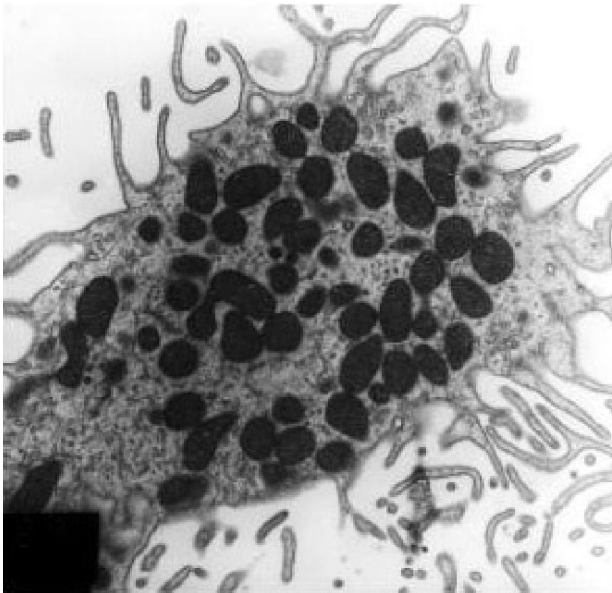


Figura 13. Mitocondrii intermediare, ME

Metode de studiu ale biologiei celulare

Fracționarea celulară

Fracționarea celulară este o tehnică de « rupere » a țesuturilor și celulelor într-un mod controlat. Se realizează astfel omogenizarea sau distrucția legăturilor celulare prin diferite procedee, separarea fracțiunilor celulare făcându-se în funcție de densitate și volum.

Tehnica de fracționarea celulară are două aplicații majore:

- *studierea compoziției chimice și a funcțiilor diferitelor componente celulare.* Implică separarea acestor componente de mediul normal celular într-o cantitate și puritate suficiente. Ex. : fracționarea celulară a fost folosită pentru înțelegerea mecanismului fosforilării oxidative desfășurat în mitocodrii, sau a evenimentelor care rezultă ca urmare a legării ribozomilor la reticulul endoplasmatic.

-identificarea localizării intracelulare a unor molecule specifice, alături de celelalte tehnici de citochimie.

Deoarece, morfologia majorității organitelor se modifică după procesul de omogenizare tisulară/celulară, tehnica fracționării celulare necesită folosirea unor procedee analitice pentru identificarea fracțiunilor celulare, ținând cont nu doar de morfologia organitelor din care ele provin, ci și de constituenții chimici și enzimatici.

Principiile fracționării celulare

Primul pas în extragerea unor cantități suficiente de organite celulare, îl reprezintă ruperea membranelor plasmatică, prin diferite procedee mecanice și chimice, urmată de separarea fracțiunilor celulare prin centrifugare, în funcție de volum și densitate.

Pentru a separa prin centrifugare diferite componente celulare se ține cont de diferențele dintre proprietățile lor fizice, din care cele mai importante sunt masa și densitatea.

Centrifugarea diferențială presupune separarea fracțiunilor celulare prin sedimentarea într-un mediu cu densitatea omogena.

Pentru ruperea membranelor plasmatică, celulele sunt suspendate într-o soluție salină cu un pH apropiat de cel mediului intracelular, de ex. sucroza- izotonică. Ulterior are loc sedimentarea

suspensiei celulare la o forță centrifugală relativă ce variază în funcție de tipul organitului celular care trebuie separat prin centrifugare, sau prin plasarea sa într-un câmp sonic de înaltă frecvență (ultrasonare).

Izolarea organitelor celulare

Procesul de separare a organitelor celulare presupune::

I. -ruperea membranelor celulare;

II.- separarea componentelor celulare prin centrifugarediferențială sau în gradient de densitate.

Distrugerea membranei celulare are loc în condiții care produc afectarea minimă a organitelor celulare.Cel mai frecvent se realizează folosind un omogenizator mecanic.

În funcție de tipul de celule, se cunosc tehnici diferite pentru fragmentarea membranei celulare (omogenizatorul Dounce este de obicei utilizat pentru culturile de celule, omogenizatorul Potter-Elvehjem pentru țesuturile fragile -ficat).

Omogenizarea celulelor sau a țesuturilor cauzează de obicei distrugerea parțială a unor organite.

După fracționarea peretelui celular, suspensiile respective sunt centrifugate pentru separarea diferitelor tipuri de componente celulare. Aceste componente sunt purificate din omogenat:

- prin centrifugari succesive la viteze de centrifugare din ce în ce mai mari luându-se în calcul masa fiecărei fracțiuni (centrifugare diferențială);

- prin centrifugare în gradient de densitate. În tubul de centrifugă se generează benzi (faze) de lichid cu densități diferite, componentele celulare migrând catre poziția (faza/banda) cu care intră în echilibru.

Lizozomii și peroxizomii, care au mărimi și densități asemănătoare, sunt mai greu de separat. De asemenea, fragmentele membranare derivate din REN, complexul Golgi, endozomi și membranele plasmatică sunt recunoscute prin formarea de vezicule cu suprafețe netede, dar care frecvent sunt greu de separat.

Izolarea unui anumit organit celular poate fi facilitată prin creșterea numărului. De exemplu, când cobaii sunt tratați cu clofibrat, numărul peroxizomilor în celulele hepatice crește considerabil. Creșterea numărului de organite celulare, care apare după administrarea diversilor compuși chimici, are ca rezultat îmbunătățirea purificării pe tipuri de organite.