

de histologie, citologie și embriologie este strâns legat cu predarea altor discipline medico-biologice : biologia, anatomia, fiziologia, biochimia, anatomia patologică și disciplinele clinice. Astfel, dezvoltarea legităților de bază ale organizării structurale a celulelor servește drept bază pentru expunerea problemelor geneticii în cursul de biologie. Pe de altă parte, expunerea problemelor cu privire la evoluția materiei vii în cursul de biologie este o condiție necesară pentru studierea diferitelor niveluri de organizare a materiei vii în organismul omului.

Studierea legităților dezvoltării și structurii organelor în cursul de anatomie se bazează pe datele analizei histologice. În prezent, când cercetarea structurilor celulare și tisulare se realizează la niveluri subcelular și molecular cu folosirea metodelor biochimice, se constată o relație deosebit de strânsă a histologiei, citologiei și embriologiei cu biochimia. În învățămînt, în cercetările științifice și în diagnosticarea clinică au o largă întrebuințare datele cito- și histochemice. Cunoașterea structurii normale a celulelor, țesuturilor și organelor este o condiție necesară pentru înțelegerea mecanismelor de modificare în ele în condiții patologice. De aceea histologia, citologia și embriologia sînt strîns legate cu anatomia patologică și cu multe discipline clinice (bolile interne, obstetrica și ginecologia ș. a.).

Astfel, histologia cu citologia și embriologia ocupă un loc important în sistemul învățămîntului medical, punînd bazele concepției științifice structural-funcționale în analiza activității vitale a organismului uman în normă și patologie.

Capitolul II

METODELE DE CERCETARE ÎN HISTOLOGIE, CITOLOGIE ȘI EMBRIOLOGIE

În histologia, citologia și embriologia modernă se întrebunțează diverse metode de explorare, care permit studierea multilaterală a proceselor de dezvoltare, structură și funcție ale celulelor, țesuturilor și organelor.

Etapele principale de analiză citologică și histologică sînt alegerea obiectului de studiu, pregătirea lui pentru cercetare în microscop, folosirea metodelor de microscopie, analiza calitativă și cantitativă a imaginilor.

Drept obiecte de studiu servesc celulele și țesuturile vii și moarte (fixate), imaginile lor văzute în microscopie optice și electronice sau pe ecranul televizat al displeiului. Există un șir de metode, care permit analiza obiectelor sus-numite.

METODELE DE CERCETARE A CELULELOR ȘI ȚESUTURILOR VII

Studierea celulelor și țesuturilor vii permite obținerea unei informații mai ample despre activitatea lor vitală — a urmări mișcarea, procesele de diviziune, distrugere, creștere, diferențiere și interacțiunea celulelor, durata ciclului lor de viață, schimbările reactive ca răspuns la influența diferiților factori.

Cercetarea vitală a celulelor în organism (in vivo). Una din metodele vitale de cercetare este observarea structurilor în organismul viu. Cu ajutorul microscopelor-iluminatoare de transmisie specială, de exemplu, se poate studia în dinamică circulația singelui în microvase. După anestezie obiectul de studiu la animal (de exemplu, mezenterul intestinului) se scoate afară și se examinează în microscop, totodată țesuturile trebuie să fie permanent umețate cu soluție cloruro-sodică izotopică. Însă durata unei asemenea observări este limitată. Rezultate mai bune se obțin prin metoda de încorporare a camerelor transparente în organismul animalului. Cel mai comod organ pentru încorporarea acestor camere și observarea ulterioară este urechea animalului (de exemplu, a iepurelui). Sectorul urechii cu camera transparentă se plasează pe măsuta microscopului, studiindu-se astfel dinamica schimbărilor din celule și țesuturi un timp îndelungat. Astfel pot fi studiate procesele de deplasare a leucocitelor din vasele sanguine, diverse stadii de formare a țesutului conjunctiv, a capilarelor, nervilor și alte procese. În calitate de cameră transparentă naturală poate fi folosit ochiul animalelor de laborator. Celulele, țesuturile și probele de organe se plasează în lichidul camerei anterioare a ochiului în colțul, format de corneea și iris, și pot fi studiate prin corneea transparentă. Astfel a fost realizată transplantarea ovulului fecundat și urmărite stadiile timpurii de dezvoltare a embrionului. Maimuțelor li s-au transplantat piese mici de uter și au fost studiate schimbările tunicii mucoase a uterului în diferite faze ale ciclului menstrual.

O aplicare largă are metoda de transplantare a celulelor singelui și măduvei osoase de la animalele-donatoare sănătoase la animalele care au fost supuse unei iradierii mortale. Animalele-recipienti după transplantare erau vii datorită acceptării celulelor donatorului, care formează în splină colonii de celule hematopoietice. Cercetarea numărului de colonii și a componenței lor celulare permite a se stabili cantitatea de celule hematopoietice fondatoare și diferitele stadii de diferențiere a lor. Cu ajutorul metodei de formare a coloniilor s-au stabilit sursele de dezvoltare a tuturor celulelor sanguine.

Cercetările structurilor vii în cultura de celule și țesuturi (in vitro). Această metodă e una dintre cele mai răspândite.

Celulele, probele mici de țesuturi sau organe, separate din organismul omului sau animalelor, se plasează în vase de sticlă sau masă plastică, care conțin un mediu nutritiv special — plasmă sanguină, extract embrionar și stimulatori ai creșterii celulelor. Se disting culturi suspendate (celulele sînt suspendate în mediu) și culturi monostratificate (celulele explantate formează pe sticlă un strat continuu). Se asigură sterilitatea mediului și temperatura ce corespunde temperaturii corpului. În asemenea condiții celulele păstrează timp îndelungat indicii de bază ai activității vitale — capacitatea de creștere, înmulțire, diferențiere, mișcare. Asemenea culturi pot exista multe zile, luni și chiar ani, dacă se reinnoiește mediul de cultivare și se transplantează celulele viabile în alte vase. Unele tipuri de celule, datorită schimbărilor în genomul lor, pot să se păstreze și să

se dividă în cultură practic pînă la infinit, formînd linii celulare neîntrerupte. În elaborarea metodelor de cultivare a celulelor și țesuturilor un mare aport l-au adus A. A. Maximov, A. V. Rumeanțev, N. G. Hlopin, A. D. Timofeevskii, F. M. Lazarenco. În prezent au fost obținute linii celulare de fibroblaste, miocite, epiteliocite, macrofage ș. a., care există de mulți ani.

Folosirea metodei de cultivare a permis evidențierea unui șir de legități ale diferențierii, regenerării maligne a celulelor, interacțiunilor celulare, interacțiunilor celulelor cu virușii și microbii. S-a demonstrat capacitatea celulelor cartilaginoase de a forma în cultură substanța intercelulară, iar a celulelor suprarenalelor — de a produce hormoni. Cultivarea țesuturilor și organelor embrionare a dat posibilitatea de a se urmări dezvoltarea osului, pielii și a altor organe. A fost elaborată metoda de cultivare a celulelor nervoase.

Metoda de cultivare a țesuturilor are o deosebită importanță pentru efectuarea observațiilor experimentale asupra celulelor și țesuturilor omului. Celulele luate din organismul omului în timpul biopsiei pot fi folosite în cultura țesuturilor pentru stabilirea genului, bolilor ereditare, regenerării maligne, descoperirea acțiunii unui șir de substanțe toxice. În ultimii ani culturile celulare se folosesc larg pentru hibridarea celulelor. Esența metodei de hibridare constă în faptul că din celulele de orice tip și în orice stadiu de dezvoltare pot fi obținuți hibrizi sub influența unui șir de factori — virusul paragripei inactivat, polietilenglicolului ș. a. În hibridii constituiți se formează heterocarioni, ce conțin două tipuri de genotip. Studiarea produselor proteice ale activității genelor permite a se stabili localizarea genelor în componența cromozomilor. Pe baza metodei de hibridare a fost creată metoda de obținere a anticorpilor monoclonali, care permite evidențierea diferitelor stadii de dezvoltare a celulelor imunocompetente ș. a.

Este necesar a se ține cont, însă, și de neajunsurile metodei, care trebuie să fie evidențiate în timpul aprecierii rezultatelor obținute. Izolarea celulelor de organism conduce la o serie de schimbări ale condițiilor existenței lor: se pierd legăturile reciproce cu alte celule și țesuturi, influența complexului de factori neurohormonali de regulare ș. a. Pentru lichidarea acestui neajuns se întrebuițează cultivarea in vivo, cînd probele de țesuturi și organe se plasează în camere din material poros, care se implantează într-o porțiune a corpului animalului (în cavitatea abdominală, sub piele ș. a.).

Colorația vitală și supravitală. În timpul colorației vitale a celulelor și țesuturilor colorantul se introduce în organismul animalului, totodată el colorează selectiv anumite celule, organele lor sau substanța intercelulară. De exemplu, albastru de tripan sau carminul litinat evidențiază fagocitele, alizarina-matricea osului nou format.

Colorație supravitală se numește colorația celulelor vii, separate din organism. Astfel se evidențiază formele tinere ale eritrocitelor — reticulocitele singelui (colorantul albastru de briliant-crezil), mitocondriile în celule (colorantul verde Eanus), lizozomii (colorantul roșu-neutru).

CERCETAREA CELULELOR ȘI ȚESUTURILOR MOARTE (FIXATE)

Obiectul principal de studiu aici îl constituie **preparatele histologice** pregătite din structuri fixate. Preparatul poate să prezinte un **frotiu** (de exemplu, frotiu de sânge, măduvă osoasă, salivă, lichid cefalorahidian ș. a.), o **amprentă** (de exemplu, a splinei, timusului, ficatului), o **peliculă** din țesut (de exemplu, conjunctiv sau peritoneu, pleură, Pia mater), o **secțiune** subțire. Mai frecvent pentru cercetări se folosește secțiunea țesutului sau organului. Preparatele histologice pot fi studiate și fără o pregătire specială. De exemplu, frotiul de sânge, amprenta, pelicula sau secțiunea organului pregătite deja pot fi examinate imediat sub microscop. Dar pentru că structurile posedă un contrast slab, ele se evidențiază prost în microscopul optic obișnuit și e necesar a se întrebuița microscopae speciale (cu contrast de fază ș. a.). De aceea mai des se folosesc preparate prelucrate special: fixate, incluse într-un mediu solid și colorate.

Procesul de pregătire a preparatului histologic pentru microscopia optică și electronică include următoarele etape esențiale: 1) colectarea materialului și fixarea lui, 2) condensarea materialului, 3) prepararea secțiunilor, 4) colorația sau contrastarea secțiunilor. Pentru microscopia optică e necesară încă o etapă — includerea secțiunilor în balsam sau în alte medii transparente (5).

Fixarea asigură prevenirea proceselor de descompunere, ceea ce contribuie la menținerea integrității structurilor. Aceasta se realizează în felul următor: proba mică luată din organ sau se cufundă în fixator (alcool, formalină, soluții ale sărurilor de metale grele, acid osmic, amestecuri fixatoare speciale), sau se supune unei prelucrări termice. Sub influența fixatorului în țesuturi și organe au loc schimbări fizico-chimice complicate. Cel mai important din ele este procesul de coagulare ireversibilă a proteinelor, din cauza căruia activitatea vitală închează, iar structurile devin moarte, fixate. Fixarea duce la condensarea și micșorarea pieselor și de asemenea la ameliorarea ulterioară a colorației celulelor și țesuturilor.

Condensarea pieselor, necesară pentru pregătirea secțiunilor, se realizează prin imbibarea materialului, deshidratat preventiv, cu parafină, celoidină, rășini organice. O condensare mai rapidă se obține prin întrebuițarea metodei de congelare a pieselor, de exemplu, în acid carbonic lichid.

Prepararea secțiunilor are loc pe dispozitive speciale — *microtoame* (pentru microscopia optică) și *ultramicrotoame* (pentru microscopia electronică).

Colorația secțiunilor (în microscopia optică) sau **acoperirea lor cu săruri de metal** (în microscopia electronică) se întrebuițează pentru mărirea contrastului imaginilor unor structuri în timpul examinării lor la microscop. Metodele de colorare a structurilor histologice sînt foarte variate și se aleg în dependență de problemele studiului. Coloranții histologici se împart în **acizi bazi** și **neutri**. În calitate de exemplu se poate aduce cel mai întrebuițat colorant azur II, care colorează nucleul celulelor în violet, și colorantul acid — eozina,

ce colorează citoplasma în roz-galben. Afinitatea selectivă a structurilor față de anumiți coloranți e condiționată de compoziția lor chimică și de proprietățile fizice. Structurile care se colorează bine cu coloranți acizi se numesc *oxifile*, iar cele ce se colorează cu bazici — *bazofile*. Structurile care fixează atât coloranții acizi, cât și pe cei bazici sînt neutrofile (heterofile). Preparatele colorate, de obicei, se deshidratează în alcooluri de concentrație crescîndă și se limpezesc în xilol, benzol, toluol sau în unele uleiuri. Pentru păstrarea îndelungată secțiunea histologică deshidratată se include între lamă și lamelă în balsam de Canada sau alte substanțe. Preparatul histologic pregătit poate fi folosit pentru studierea sub microscop timp de mulți ani. Pentru microscopia electronică secțiunile, obținute la ultramicrotom, se plasează pe grile speciale, se contrastează cu săruri de mangan, cobalt ș. a., apoi se studiază la microscop și se fotografiază. Microfotografiile obținute servesc drept obiect de studiu deopotrivă cu preparatele histologice.

CERCETAREA COMPONENTEI CHIMICE ȘI METABOLISMULUI CELULELOR ȘI ȚESUTURILOR

Metodele cito- și histochimice. Aceste metode permit evidențierea localizării diferitelor substanțe chimice în structurile celulelor, țesuturilor și organelor — ADN, ARN, proteinelor, glucidelor, lipidelor, aminoacizilor, substanțelor minerale, vitaminelor, activitatea fermentilor. Aceste metode se bazează pe specificul reacției dintre reactivul chimic și substratul care intră în componența structurilor celulare și tisulare, și pe colorarea produselor reacțiilor chimice. Pentru a mări specificul reacției deseori se întrebuițează controlul fermentativ. De exemplu, pentru evidențierea în celule a acidului ribonucleic (ARN) deseori se folosește galocianina — colorant cu proprietăți bazice, iar prezența ARN se confirmă cu ajutorul prelucrării de control cu ribonucleaza, care scindează ARN. Galocianina colorează ARN în albastru-violet. Dacă secțiunea este preventiv prelucrată cu ribonuclează, iar apoi colorată cu galocianină, atunci lipsa colorației confirmă prezența în structură a acidului ribonucleic. Descrierea numeroaselor metode cito- și histochimice se face în manuale speciale.

Metoda autoradiografiei. Această metodă permite studierea mai amplă a metabolismului în diferite structuri. La baza metodei se află folosirea elementelor radioactive (de exemplu, a fosforului — ^{32}P , carbonului — ^{14}C , sulfului — ^{35}S , hidrogenului — ^3H) sau a compușilor marcați cu ele. Substanțele radioactive în secțiunile histologice se evidențiază cu ajutorul emulsiei fotografice, care se aplică pe preparat și apoi se developează. În porțiunile preparatului, unde emulsia fotografică contactează cu substanța radioactivă, se produce reacția fotografică, în rezultatul căreia se formează sectoare dezvoltate (luminate) — piste. Prin această metodă se poate stabili, de exemplu, viteza de includere a aminoacizilor marcați în proteine, formarea acizilor nucleici, metabolismul iodului în celulele glandei tiroide ș. a.

Metoda centrifugării diferențiale. Această metodă se bazează pe întrebuințarea centrifugilor, care efectuează de la 20 000 pînă la 150 000 de rot/min. Asemenea centrifugi permit separarea și sedimentarea diferiților componenți celulari — a nucleilor, mitocondriilor ș. a., și determinarea compoziției lor chimice.

Interferometria. Această metodă permite aprecierea conținutului sumar de proteine în celulele vii și fixate.

În prezent, deopotrivă cu metodele calitative, au fost elaborate și se practică metodele histochemice cantitative de stabilire a conținutului diferitelor substanțe în celule și țesuturi. Particularitatea metodelor de studiu cantitativ-histochemice (spre deosebire de cele biochimice) constă în posibilitatea studierii localizării componentelor chimice în structurile concrete ale celulelor și țesuturilor.

Citospectrofotometria — metodă de studiere cantitativă a substanțelor intracelulare după spectrele lor de absorbție.

Citospectrofluorimetria — metodă de studiere cantitativă a substanțelor intracelulare după spectrele lor de fluorescență sau după intensitatea fluorescenței pe o undă aleasă din timp (citofluorimetria).

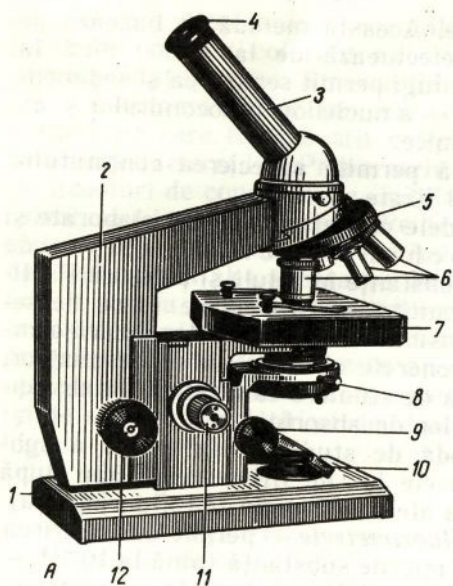
Microscopale moderne — *citofluorimetrele* — permit descoperirea în diferite structuri a unor cantități mici de substanță (pînă la 10^{-14} — 10^{-16} g) și aprecierea localizării substanțelor studiate în microstructuri.

În ultimii ani combinarea metodelor histochemice cu metoda microscopiei electronice a condus la dezvoltarea unei direcții de perspectivă noi — a histochemiei electronice. Această metodă permite studierea localizării diferitelor substanțe chimice nu numai la un nivel celular, ci și subcelular și molecular.

Metodele analizei imunofluorescente se folosesc efectiv în histologia contemporană pentru studierea proceselor de diferențiere a celulelor, evidențierea în ele a compușilor chimici și structurilor specifice. Ele se bazează pe reacțiile antigen—anticorp. Fiecare celulă a organismului are o componentă antigenă specifică, care este determinată de proteine. Produsele reacției pot fi colorate și evidențiate în microscopul luminescent. Pe desenul 13,B se demonstrează evidențierea în celulă a actinei și tubulinei cu ajutorul metodei de analiză imunofluorescentă.

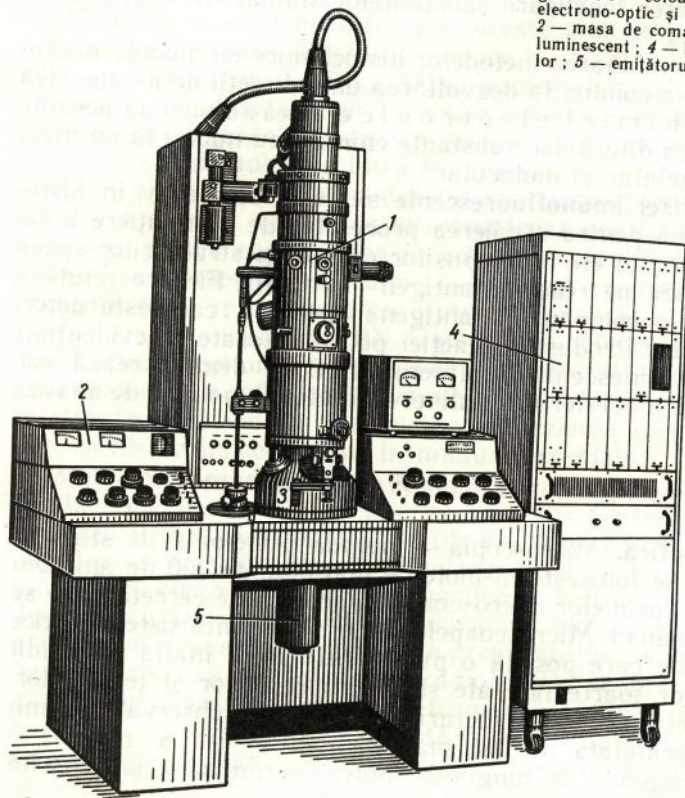
METODELE DE MICROSCOPIE A PREPARATELOR HISTOLOGICE

Microscopia optică. Microscopia — metoda principală de studiere a preparatelor — se folosește în biologie mai bine de 300 de ani. Din momentul folosirii primelor microscopie în scopuri de cercetare ele se perfecționau permanent. Microscopale moderne prezintă sisteme optice complicate diverse, care posedă o putere rezolutivă înaltă și permit studierea detaliilor foarte fine ale structurii celulelor și țesuturilor. Dimensiunea celei mai mici structuri care poate fi observată la microscop este determinată de cea mai mică distanță rezolutivă (d_0). Ea depinde de lungimea undei de lumină λ și această



Des. 1. Microscopae destinate cercetărilor biologice.

A — microscop biologic optic „Biolam-S”: 1 — baza; 2 — tubusosupport; 3 — tubusul înclinat; 4 — ocular; 5 — revolver; 6 — obiective; 7 — mäsutä; 8 — condensator cu diafragmă în formă de iris; 9 — șurubul condensatorului; 10 — oglindă; 11 — microviză; 12 — macroviză; B — microscopul electronic A.V.M.— 100 AC cu sistem automatizat de prelucrare a imaginilor: 1 — cotoana microscopului (cu sistem electrono-optic și camera pentru preparare); 2 — masa de comandă; 3 — camera cu ecran luminescent; 4 — blocul de analiză a imaginilor; 5 — emițătorul videosemnalului.



dependență se exprimă cu aproximație prin formula $d_0 = 1/2 \lambda$. Astfel, cu cât este mai mică lungimea undei de lumină, cu atât e mai mică distanța rezolutivă și cu atât mai mici sînt structurile ce pot fi observate în preparat.

Pentru studierea preparatelor histologice mai des se folosesc microscopice optice de marcă diferită, cînd în calitate de sursă de iluminare se folosește lumina naturală sau artificială (des. 1, A, B). Lungimea minimală a undei părții vizibile a spectrului de lumină corespunde 0,4 mkm. Prin urmare, la microscopul optic obișnuit distanța rezolutivă este egală aproximativ cu 0,2 mkm ($d_0 = 1/2 \cdot 0,4 \text{ mkm} = 0,2 \text{ mkm}$), iar mărirea totală (produsul dintre mărirea obiectivului și mărirea ocularului) ajunge pînă la 2500 de ori.

Microscopia ultravioletă. Aceasta e o varietate a microscopiei optice. În microscopul ultraviolet se folosesc raze ultraviolete mai scurte cu lungimea undei de circa 0,2 mkm. Distanța rezolutivă aici e de aproximativ 0,1 mkm ($d_0 = 1/2 \cdot 0,2 \text{ mkm} = 0,1 \text{ mkm}$). Imaginea invizibilă obținută în razele ultraviolete devine vizibilă cu ajutorul înregistrării pe placa fotografică sau prin întrebuițarea unor dispozitive speciale (ecran luminescent, convertizor electrono-optic).

Microscopia fluorescentă (luminescentă). Fenomenul fluorescenței constă în aceea că atomii și moleculele unor substanțe, absorbînd razele cu undă scurtă, trec în stare excitată. Trecerea inversă din stare excitată în normală are loc cu emanare de lumină, dar cu altă lungime de undă, mai mare. Pentru excitarea fluorescenței în microscopul fluorescent se folosesc lămpile de cuarț și xenon de presiune supraîntă, care posedă o intensitate înaltă în regiunea spectrului de 0,25—0,4 mkm (raze ultraviolete apropiate) și de 0,4—0,5 mkm (raze albastru-violete). Lungimea undei de lumină fluorescentă întotdeauna e mai mare decît lungimea de undă a luminii de excitare, de aceea ele se despart cu ajutorul filtrelor de lumină și imaginea obiectului se studiază numai în lumina fluorescentă. Se deosebesc **fluorescența proprie**, sau **primară**, și **indusă**, sau **secundară**. Orice celulă a organismului viu posedă o fluorescență proprie, dar ea deseori este extrem de slabă. Fluorescența secundară apare în timpul prelucrării preparatelor cu coloranți speciali — **fluorocromi**. De exemplu, pentru prelucrarea preparatelor mai des se folosește fluorocromul oranj de acridină. În acest caz ADN și compușii lui posedă luminescență verde-aprinsă, iar ARN și derivații lui — roșu-aprins: Astfel, componența spectrală a radiației poartă informația despre structura internă a obiectului și componența lui chimică. Varianta metodei de microscopie fluorescentă, în timpul căreia și excitarea, și iradierea fluorescenței are loc în regiunea ultravioletă a spectrului, a fost denumită metodă de **microscopie fluorescentă ultravioletă**.

Microscopia cu contrast de fază. Această metodă servește la obținerea imaginilor contrastante ale obiectelor transparente și incolore, invizibile în timpul folosirii metodelor obișnuite de microscopie. Pentru studierea preparatelor în microscopul obișnuit optic contrastul structurilor se obține cu ajutorul colorării. Metoda contrastului de fază asigură contrastul necesar al structurilor incolore studiate cu

ajutorul unei diafragme circulare speciale, instalată în condensator, și cu ajutorul așa-numitei plăci de fază, situată în obiectiv. O asemenea construcție a opticii microscopului face posibilă transformarea schimbărilor de fază a luminii nepercepute de ochi, care trece prin preparatul incolor, în amplituda ei, adică se intensifică imaginea obținută. Mărirea contrastului permite observarea tuturor structurilor, care se deosebesc după indicii de refracție. O varietate a metodei cu contrast de fază este **metoda de contrast de fază în câmp întunecat**, care dă o imagine negativă spre deosebire de cea pozitivă cu contrast de fază.

În afară de metodele enumerate, cu scopuri speciale se folosesc **microscopia în câmp întunecat** pentru studierea obiectelor vii, **în lumină incidentă** pentru examinarea obiectelor groase, **microscopia polarizantă** pentru studierea arhitectonicii structurilor histologice. Descrierea acestor metode și aparatelor respective este dată în manuale speciale.

Microscopia electronică. Un mare pas înainte în dezvoltarea tehnicii microscopiei a fost crearea și întrebuințarea microscopului electronic (vezi des. 1, B). În microscopul electronic se folosește un flux de electroni cu lungimile de undă mai scurte decât în cel optic. La intensitatea de 50 000 V lungimea unei oscilații electromagnetice, care apar în timpul mișcării fluxului de electroni în vid, este egală cu 0,0056 nm. Teoretic a fost calculat că distanța rezolutivă în aceste condiții poate fi de circa 0,002 nm sau 0,000002 mkm, adică de 100 000 ori mai mică decât în microscopul optic. În cele mai calitative microscopie electronice moderne distanța rezolutivă constituie 0,1—0,7 nm.

Cu ajutorul microscopului electronic de transmisie se poate obține doar o imagine plană a obiectului studiat. Pentru obținerea unei prezentări de spațiu despre structuri se folosesc microscopie electronice de raster, capabile să creeze imagini tridimensionale. Microscopul electronic de raster lucrează conform principiului scanării cu microsonda electronică a obiectului studiat, adică el „pipăie“ succesiv cu ajutorul fasciculului de electroni focalizat puternic diferite puncte ale suprafeței. Pentru cercetarea sectorului ales microsonda se mișcă pe suprafața lui sub influența bobinelor de deviere (principiul desfășurării televizate). O asemenea cercetare a obiectului se numește **scanare** (colaționare), iar desenul pe care se mișcă microsonda — **raster**. Microscopul electronic de raster nu înregistrează electronii care trec prin obiect, ci acumulează toți electronii (secundari), scoși din atomii probei de către fluxul de electroni al microsondei (electroni primari). Imaginea obținută este reprodusă pe ecranul televizat a cărui rază electronică se mișcă sincron cu microsonda.

Calitățile principale ale microscopiei electronice de raster sînt profunzimea netității (diapazonul de 100—1000 de ori mai mare decât la microscopie optice), frecvența mare a modificării neîntrerupte a măririi (de la zeci pînă la zeci de mii de ori) și puterea rezolutivă înaltă.

METODELE DE ANALIZĂ A IMAGINILOR STRUCTURILOR CELULARE ȘI TISULARE

Imaginile microobiectelor obținute în microscop, pe ecranul televizat al displeiului, pe microfotografiile electronice se supun unei analize speciale — evidențierea parametrilor morfometrici, densitometrici și prelucrarea lor statistică.

Metodele morfometrice permit determinarea cu ajutorul unor grile speciale (ale lui E. Veibel, A. A. Glagolev, S. B. Stefanov) a numărului oricăror structuri, suprafețele, diametrele ș. a. De exemplu, în celule pot fi măsurate suprafețele nucleilor, citoplasmei, diametrele lor, raporturile nucleo-citoplasmice ș. a. Există morfometria manuală și morfometria automatizată, în timpul căreia toți parametrii se măsoară și se înregistrează în aparat automat.

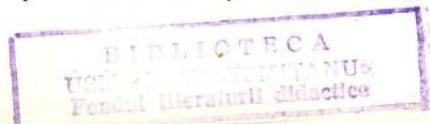
În ultimii ani o răspândire tot mai mare o au **sistemele automatizate de prelucrare a imaginilor (S.A.P.I)**, care permit realizarea mai eficientă a metodelor cantitative enumerate de studiere a celulelor și țesuturilor. Totodată posibilitățile analitice ale microscopiei cantitative se completează cu metode de analiză și stabilire a probelor, bazate pe prelucrarea cu ajutorul mașinilor electronice de calcul (M.E.C.) a informației, extrase din imaginile celulelor și țesuturilor. În fond se poate vorbi despre dispozitivele care nu numai măresc posibilitățile optice ale analizorului vizual al omului, dar și largesc de multe ori posibilitățile lui analitice. Se exprimă părerea că S.A.P.I. înfăptuiesc aceeași revoluție în morfologie, precum circa 300 de ani în urmă a provocat inventarea microscopului optic, iar circa 35 ani în urmă — a celui electronic, deoarece ele nu numai măresc incomparabil productivitatea muncii savantului și nu numai obiectivizează cercetările, dar și permit obținerea unei noi informații despre procesele neevidențiate mai înainte, modelarea cantitativă și prognozarea dezvoltării lor în celule și țesuturi.

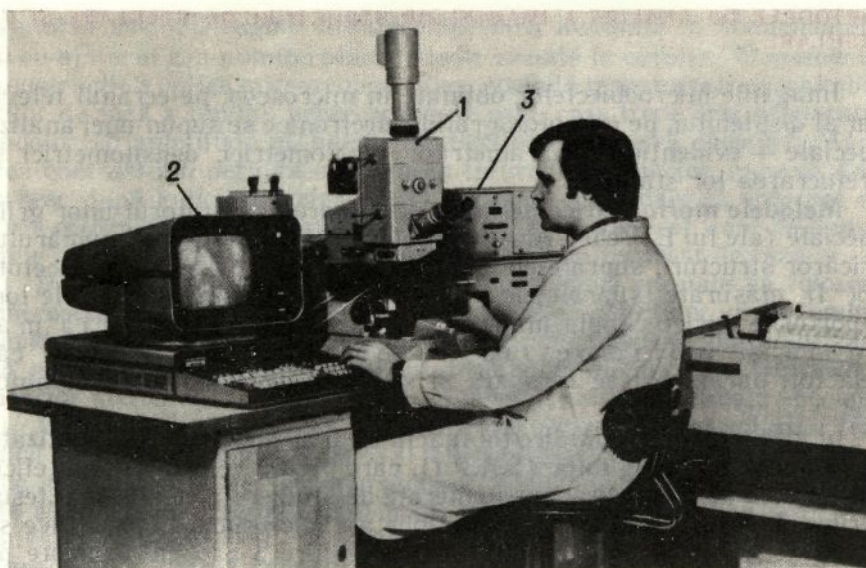
Totodată participarea în experiență a M.E.C. cere de la savant o atitudine nouă în ce privește realizarea ei, posedarea dexterității compunerii algoritmilor procesului de cercetare, o exactitate a raționamentelor și, în sfârșit, ridicarea nivelului studiului metodico-științific.

Una din metode, care lărgeste considerabil numărul problemelor morfologice rezolvate, este *analiza mecanizată optico-structurală (A.M.O.S.)*, propusă în anul 1965 de către C. M. Bogdanov. Cu apariția A.M.O.S. a fost făcut un pas calitativ nou în elaborarea metodologiei unice de analiză cantitativă a microstructurilor pe baza caracteristicilor statistice. În ultimul timp A.M.O.S. a găsit o aplicare efectivă în practica de cercetare și în economia națională.

În des. 2 e prezentat sistemul automatizat de prelucrare a imaginilor „Protva M II” produs de firma „LOMO”. Sistemul este destinat studierii complexe a celulelor și țesuturilor cu folosirea metodelor de microscopie fluorescentă, de absorbție și radioautografie.

Un microscop optic scanator special sau altul electronic, care

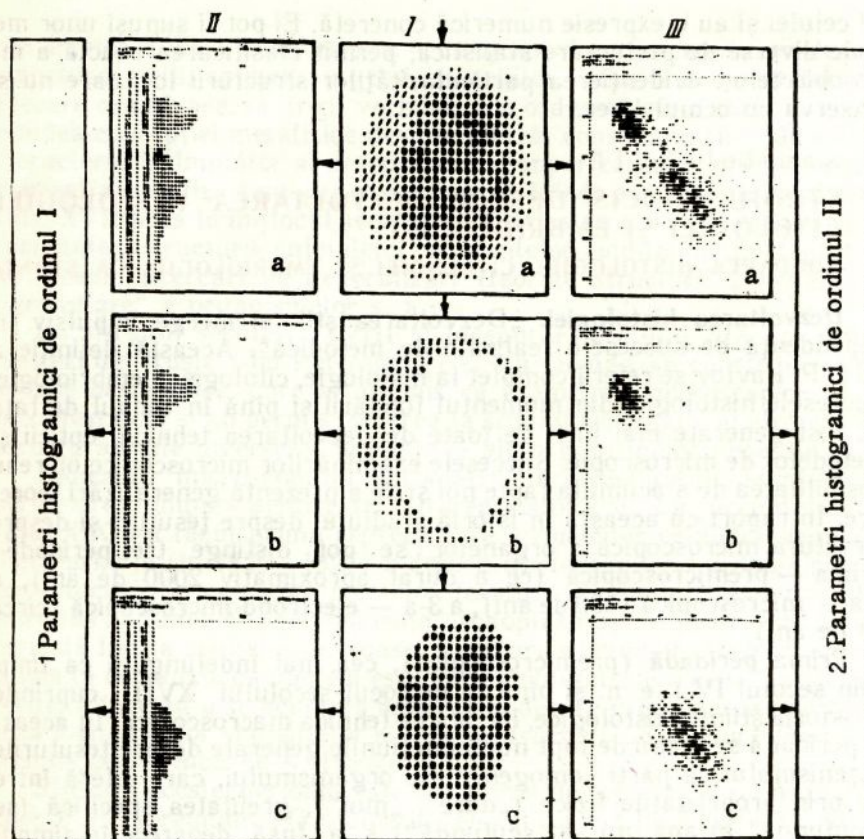




Des. 2. Sistem automatizat de prelucrare a imaginilor „Protva-M11”.
1 — microscop-fotometru scanator; 2 — displei; 3 — M.E.C.

intră în componența sistemului, realizează vizionarea consecutivă a imaginii preparatului pe două coordonate, transformînd-o în formă numerică, și o introduce în M.E.C., care la rîndul ei efectuează prelucrarea cifrică a imaginii și dă o informație despre caracteristicile geometrice ș. a. ale obiectului analizat. Cu ajutorul displeiului colorat savantul poate „prepara” imaginea, evidențiind numai acele componente structurale, care îl interesează. Acumulatorile de informație de capacitate mare pe discuri magnetice sau benzi, care intră în componența M.E.C., permit memorizarea imaginii precum și a rezultatelor prelucrării ei pentru păstrarea ulterioară și documentare.

Folosirea metodelor de analiză automatizată a microobiectelor o vom examina pe baza exemplului de prelucrare a imaginii leucocitului sîngelui (des. 3). Microscopul-fotometru scanator permite „cercetarea” valorilor densității optice cu pasul indicat de savant. În consecință semnalul optic, care corespunde densității optice a obiectului, trece în formă cifrică. Matricea cifrică obținută este supusă preparării cu ajutorul unui aparat matematic special. La început se lichidează fondul și se separă obiectul „curat” — imaginea celulei (I a), apoi din imaginea celulei se evidențiază orice detaliu, care îl interesează pe savant, de exemplu, citoplasma (I b) și nucleul (I c). M.E.C. calculează și construiește histograma densității optice pentru toată celula (II a), pentru citoplasma (II b) și nucleul (II c) ei. În histograma întregă de acum se pot evidenția fazele citoplasmei (b) și nucleului (c) și, de asemenea, se pot obține separat pentru fiecare structură (II b, II c).



Des. 3. Schema prelucrării automatizate a imaginii celulei. Imaginea leucocitului (a), citoplasmei (b) și nucleului (c) lui. I — imaginea cifrică; II — histograma densității optice; III — histogramele bidimensionale ale dependenței valorilor densității optice.

Pe histograme se calculează parametrii de ordinul I: valoarea medie și integrală a densității optice, dispersia, asimetria, excesul ș. a. Conform imaginii obiectului se obțin parametrii morfometrici: suprafața, perimetrul, diametrul, raportul nucleocitoplasmatic, coeficientul formei ș. a.

Următoarea etapă de prelucrare a imaginii este construirea diagramelor bidimensionale a independenței densității optice pentru toată celula (vezi des. 3 III), citoplasma (III b) și nucleul (III c) ei. Ca și în primul caz, pe diagrama întregii celule (III a) e posibilă evidențierea fazei citoplasmei (III b) și nucleului (III c). Aceste diagrame permit calcularea parametrilor histogramici de ordinul II: omogenitatea, contrastul local, entropia ș. a. Parametrii obținuți astfel prezintă „portretul” multidimensional