

**Junqueira**

# Histologie

tratat & atlas

**Anthony L. Mescher, PhD**

Professor of Anatomy and Cell Biology  
Indiana University School of Medicine  
Bloomington, Indiana



Editura Medicală  
**CALLISTO**  
[www.callisto.ro](http://www.callisto.ro)

ELEMENTE CHEIE VI / PREFAȚĂ IX / MULTUMIRI XI

## **1 Histologia și metodele de studiu ale acesteia 1**

- Pregătirea țesuturilor pentru studiu 1  
Microscopia optică 5  
Microscopia electronică 8  
Autoradiografia 10  
Culturile de celule și țesuturi 10  
Histochimia enzimatică 11  
Vizualizarea moleculelor specifice 11  
Interpretarea structurilor în secțiuni tisulare 16  
Rezumat 17

## **2 Citoplasma 18**

- Diferențierea celulară 18  
Organitele celulare 18  
Citoscheletul 41  
Incluziunile celulare 49  
Rezumat 53

## **3 Nucleul 55**

- Componentele nucleului 55  
Ciclul celular 60  
Mitoza 63  
Celulele stem și regenerarea tisulară 65  
Meioza 67  
Apoptoza 69  
Rezumat 71

## **4 Țesutul epitelial 73**

- Caracteristicile celulelor epiteliale 73  
Structurile specializate ale suprafeței celulare apicale 78  
Tipuri de epitelii 81  
Transportul transepitelial 90  
Reînnoirea celulelor epiteliale 91  
Rezumat 93

## **5 Țesutul conjunctiv 98**

- Celulele țesutului conjunctiv 98  
Fibrele 105  
Substanța fundamentală 113

- Tipuri de țesut conjunctiv 117  
Rezumat 122

## **6 Țesutul adipos 124**

- Țesutul adipos alb 124  
Țesutul adipos brun 128  
Rezumat 129

## **7 Țesutul cartilaginos 130**

- Cartilajul hialin 130  
Cartilajul elastic 134  
Fibrocartilajul 134  
Formarea cartilajului, creșterea și repararea 135  
Rezumat 137

## **8 Țesutul osos 138**

- Celulele osoase 138  
Matricea osoasă 143  
Periostul și endostul 143  
Tipuri de țesut osos 145  
Osteogeneza 148  
Creșterea, remodelarea și repararea osoasă 152  
Rolul metabolic al osului 154  
Articulațiile 155  
Rezumat 158

## **9 Țesutul nervos și sistemul nervos 160**

- Dezvoltarea țesutului nervos 160  
Neuronii 161  
Celulele gliale și activitatea neuronală 167  
Sistemul nervos central 174  
Sistemul nervos periferic 180  
Plasticitatea și regenerarea neuronală 185  
Rezumat 187

## **10 Țesutul muscular 191**

- Mușchiul scheletic 191  
Mușchiul cardiac 205  
Mușchiul neted 207  
Regenerarea țesutului muscular 210  
Rezumat 211

## **11 Sistemul circulator 212**

- Inima 212
- Componentele tisulare ale peretelui vascular 216
- Sistemul vascular sanguin 217
- Sistemul vascular limfatic 228
- Rezumat 232

## **12 Sângele 234**

- Compoziția plasmei 234
- Celulele sanguine 235
- Rezumat 249

## **13 Hematopoieza 250**

- Celulele stem, factorii de creștere și diferențiere 250
- Măduva osoasă 251
- Maturarea eritrocitelor 254
- Maturarea granulocitelor 256
- Maturarea agranulocitelor 258
- Originea trombocitelor 259
- Rezumat 261

## **14 Sistemul imunitar și organele limfoide 262**

- Imunitatea înnăscută și imunitatea dobândită 262
- Citokinele 264
- Antigenele și anticorpii 265
- Prezentarea antigenului 266
- Celulele imunității dobândite 268
- Timusul 272
- Țesutul limfatic asociat mucoaselor 276
- Ganglionii limfatici 276
- Splina 281
- Rezumat 288

## **15 Tubul digestiv 289**

- Structura generală a tubului digestiv 289
- Cavitatea bucală 292
- Esofagul 299
- Stomacul 301
- Intestinul subțire 309
- Intestinul gros 316
- Rezumat 319

## **16 Organele anexe ale tubului digestiv 323**

- Glandele salivare 323
- Pancreasul 326
- Ficatul 329
- Căile biliare și vezica biliară 339
- Rezumat 340

## **17 Sistemul respirator 343**

- Cavitatele nazale 343
- Rinofaringe 346
- Laringe 346
- Traheea 348
- Arborele bronșic și plămânii 348
- Vascularizația și inervația pulmonară 360
- Membranele pleurale 362
- Mișcările respiratorii 362
- Rezumat 363

## **18 Tegumentul 364**

- Epidermul 365
- Dermul 371
- Țesutul subcutanat 373
- Receptorii senzitivi 373
- Firul de păr 374
- Unghiile 377
- Glandele cutanate 378
- Repararea țesutului cutanat 383
- Rezumat 384

## **19 Sistemul urinar 385**

- Rinichii 385
- Circulația săngelui 386
- Funcțiile renale: filtrare, secreție și reabsorbție 387
- Ureterele, vezica urinară și uretra 398
- Rezumat 403

## **20 Glandele endocrine 404**

- Glanda pituitară (hipofiza) 404
- Glandele suprarenale 414
- Insulele pancreaticice 418
- Sistemul neuroendocrin difuz 420
- Glanda tiroidă 420
- Glandele paratiroide 423
- Glanda pineală 425
- Rezumat 426

## **21 Sistemul reproducător masculin 429**

- Testiculele 429
- Căile intratesticulare 439
- Căile genitale excretoare 439
- Glandele genitale anexe 441
- Penisul 445
- Rezumat 447

**22 Sistemul reproducător feminin 449**

- Ovarele 449
- Trompele uterine 459
- Etapele principale ale fecundației 460
- Uterul 462
  - Implantarea embrionului, decidua și placenta 467
- Colul uterin 470
- Vaginul 471
- Organele genitale externe 471
- Glandele mamare 472
- Rezumat 477

**23 Ochiul și urechea: organe de simț speciale 479**

- Vedere: sistemul fotoreceptor 479
- Auzul: sistemul audiovestibular 497
- Rezumat 510

**ANEXĂ 513****ILUSTRĂȚII 515****INDEX 517**

# Histologia și metodele de studiu ale acesteia

## PREGĂTIREA ȚESUTURILOR PENTRU STUDIU

- Fixarea
- Includerea și secționarea
- Colorarea

## MICROSCOPIA OPTICĂ

- Microscopia în câmp luminos
- Microscopia cu fluorescență
- Microscopia cu contrast de fază
- Microscopia confocală
- Microscopia cu lumină polarizată

## MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

- Microscopia electronică de transmisie
- Microscopia electronică cu scanare

<b>1</b>	<b>AUTORADIOGRAFIA</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>CULTurile DE CELULE ȘI ȚESUTURI</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>HISTOCHIMIA ENZIMATICĂ</b>	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>VIZUALIZAREA MOLECULELOR SPECIFICE</b>	<b>12</b>
5	Imunohistochimia	13
6	Tehnici de hibridizare	15
<b>8</b>	<b>INTERPRETAREA STRUCTURILOR DIN SECȚIUNI TISULARE</b>	<b>16</b>
<b>10</b>	<b>REZUMAT</b>	<b>17</b>

**H**istologia este știința care se ocupă cu studiul țesuturilor organismului și cu modul în care aceste țesuturi sunt organizate pentru a forma organe. Rădâcina greacă *histo* poate fi tradusă prin "țesut" sau "țesătură", ambele variante fiind adecvate, deoarece țesuturile reprezintă în general rețele interconectate de filamente și fibre, structuri celulare și noncelulare, cu delimitare membranară. Histologia implică toate aspectele biologiei tisulare, cu accent pe modul în care structura și disponerea celulelor optimizează funcțiile specifice fiecărui organ.

Țesuturile au două componente care interacționează: celulele și matricea extracelulară (MEC). MEC este alcătuită din numeroase tipuri de macromolecule, majoritatea dintre ele formând structuri complexe, cum ar fi fibrile de colagen și membranele bazale. Funcțiile principale ale MEC sunt asigurarea suportului mecanic al celulelor, transportul elementelor nutritive către celule, și transportul în sens invers al produșilor de catabolism și secreție ai celulelor. Celulele produc MEC, dar sunt și influențate și uneori controlate de moleculele matriceale. Între celule și matrice există deci numeroase interacțiuni, multe componente ale matricei fiind recunoscute de receptorii de pe suprafața celulelor, de care se atașează. Multă dintre acești receptorii proteici traversează membrana celulară și vin în contact cu componente structurale din interiorul celulei. Astfel, celulele și MEC formează un tandem care funcționează unitar și reacționează unitar la factori stimulatori sau inhibitori.

Fiecare dintre țesuturile fundamentale ale organismului este format prin mai multe tipuri de asocieri specifice între celule și MEC. Aceste asocieri caracteristice ușurează recunoașterea

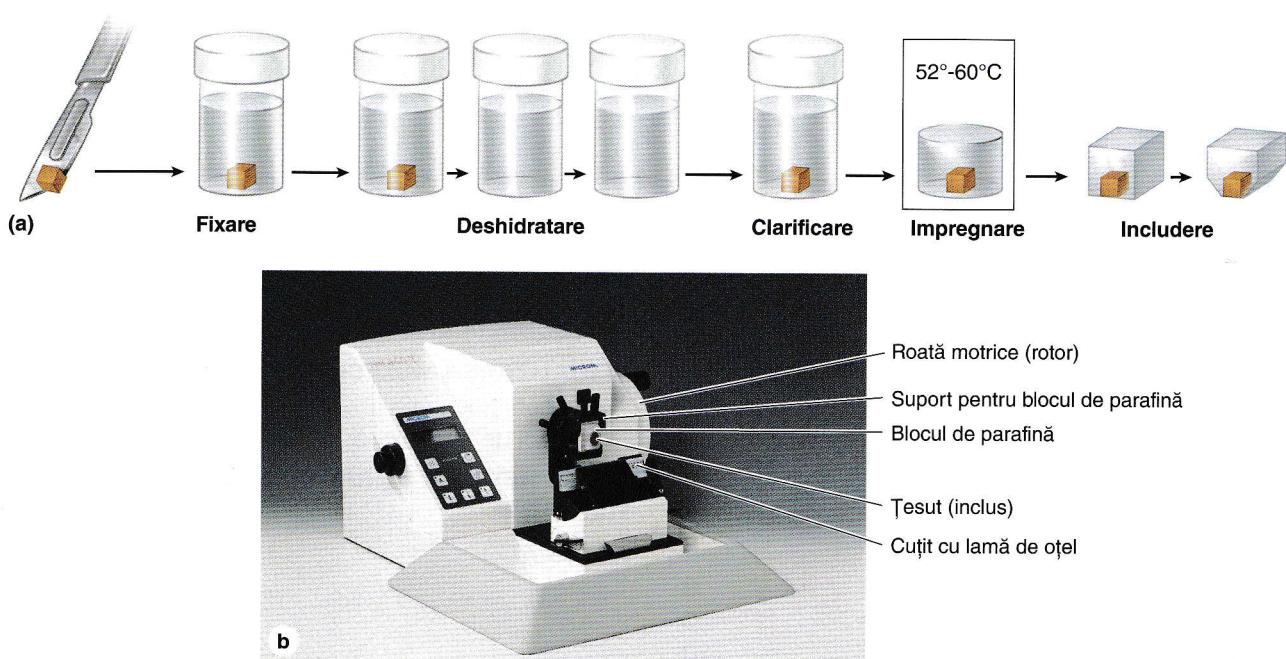
tipurilor de țesuturi de către studenți. Organele sunt formate printr-o îmbinare ordonată a mai multor țesuturi, iar combinarea precisă a acestora permite funcționarea fiecărui organ și a organismului ca un întreg.

Dimensiunile mici ale celulelor și ale componentelor matriceale impun utilizarea în histologie a microscopelor și a metodelor de studiu molecular. Progresele realizate în biochimie, biologie moleculară, fiziologie, imunologie și patologie sunt esențiale pentru cunoașterea aprofundată a biologiei tisulare. Familiarizarea cu instrumentele și metodele de lucru este fundamentală în orice domeniu științific pentru o bună înțelegere a subiectului abordat. Acest capitol trece în revistă mai multe metode uzuale folosite în studiul celulelor și țesuturilor, concentrându-se pe abordările microscopice.

## ➤ PREGĂTIREA ȚESUTURILOR PENTRU STUDIU

Metoda folosită cel mai frecvent pentru studiul țesuturilor constă în prepararea de secțiuni histologice (feli), care pot fi examinate la microscopul optic. În microscopia optică, fasciculul de lumină străbate secțiunile tisulare și dă naștere unor imagini care sunt examinate vizual. Deoarece majoritatea țesuturilor și organelor sunt prea groase pentru a permite trecerea luminii prin ele, acestea trebuie secționate pentru a obține secțiuni subțiri și translucide, care ulterior sunt plasate pe lame de sticlă în vederea examinării la microscop.

FIGURA 1-1 Secționarea țesutului fixat și inclus.



Majoritatea țesuturilor studiate histologic sunt pregătite după cum urmează, în această secvență a etapelor **(a)**:

- Fixare:** Bucăți mici din țesut sunt introduse în soluții chimice care conservă proteinele prin formarea unor legături încrucisate și care inactivează enzimele de degradare.
- Deshidratare:** Țesutul este trecut printre serie de soluții de alcool de concentrații crescătoare, ultima fiind de 100%, în scopul îndepărțării complete a apei.
- Clarificare:** Alcoolul este înlocuit de toluen sau de alți agenți, cu care atât el cât și parafina sunt miscibili.
- Impregnare:** Țesutul este apoi introdus în parafină topită până când devine complet impregnat cu această substanță.
- Includere:** Țesutul impregnat cu parafină este plasat într-o casetă cu parafină topită și lăsat să se solidifice.
- Modelare:** Blocul de parafină rezultat este ajustat (sculptat), pentru a pregăti țesutul în vederea secționării (feliere) cu ajutorul unui microtom.

Pregătirea țesutului pentru microscopie electronică de transmisie (MET) urmează etape asemănătoare, cu excepția utilizării unor fixatori și soluții de deshidratare specifici, precum și a unor fragmente tisulare mai mici. Includerea se face în acest caz în rășini epoxidice, care prin solidificare devin mai dure decât parafina și permit secționarea în felii foarte subțiri.

**(b) Microtomul** este folosit în microscopia optică pentru secționarea țesuturilor incluse în parafină. Blocul de parafină modelat este așezat în suport, iar la fiecare tură a rotorului pe care operatorul o execută, suportul avansează cu o distanță prestabilită, cuprinsă de obicei între 1 și 10 µm. La sfârșitul fiecărei curse, lama de oțel a cuțitului taie din blocul cu țesutul o secțiune cu o grosime egală cu distanța cu care a avansat blocul. Secțiunile de parafină sunt așezate pe o lamă de sticlă, lăsate să adere, deparafinate și colorate pentru examinarea la microscopul optic. În MET, secțiunile mai mici de 1 µm sunt obținute din celule incluse în rășini, cu ajutorul unui ultramicrotom ce are un cuțit de sticlă sau diamant.

Preparatul microscopic ideal este pregătit astfel încât țesutul de pe lamă să aibă aceeași structură și compoziție moleculară ca și în organism. Totuși, din punct de vedere practic, acest lucru este rareori posibil, iar din cauza procesului de preparare apar adesea artefacte, distorsiuni și pierderea unor componente. Etapele pregătirii țesutului pentru microscopia optică sunt prezentate în Fig. 1-1.

### Fixarea

Pentru a evita digestia țesuturilor de către enzimele prezente în celule (autoliză) sau de către bacterii, precum și pentru a menține structura și compoziția moleculară a acestora, fragmentele de organe (piesele) trebuie tratate cât mai curând posibil după

recoltarea din organism. Tratamentul inițial - **fixarea** - implică de obicei imersiunea în soluții ce conțin agenți stabilizatori sau care formează legături încrucisate, numiți **fixatori**. Întrucât un fixator trebuie să penetreze complet țesuturile pentru a conserva toate celulele, țesuturile sunt tăiate în fragmente mici înainte de fixare. Astfel este facilitată difuziunea fixatorului și este asigurată conservarea mai bună a țesutului. În cazul anumitor organe sau animale de laborator, se poate practica perfuzia intravasculară a fixatorului, care va ajunge rapid la țesuturi prin vasele de sânge, calitatea fixării fiind superioară.

Unul dintre fixatorii larg utilizati pentru microscopia optică este formolul, o soluție izotonă tamponată de formaldehidă 37%. Reacțiile chimice asociate procesului de fixare a diverselor componente tisulare sunt complexe și incomplet înțelese. Atât

formaldehida, cât și glutaraldehida (un fixator folosit frecvent pentru microscopia electronică) reacționează cu grupările amino ( $\text{NH}_2$ ) ale proteinelor tisulare, împiedicând degradarea acestora. Glutaraldehida consolidează procesul de fixare, fiind o dialdehidă capabilă și de a lege încrucișat proteine.

La microscopul electronic, ce permite studiul structurilor foarte mici cu o putere de mărire și la o rezoluție crescute, fixarea trebuie realizată cu atenție pentru a se păstra detaliile ultrastructurale. Din acest motiv, o metodă standard de prelucrare a țesuturilor pentru astfel de studii constă într-o dublă fixare, folosindu-se o soluție tamponată de glutaraldehida, urmată de o imersie în tetraoxid de osmu tamponat. Tetraoxidul de osmu are rolul de a conserva (și de a colora) lipidele și proteinele membranare.

## Includerea și secționarea

Țesuturile sunt incluse într-un mediu solid pentru a facilita secționarea. Pentru a putea fi tăiate în secțiuni foarte subțiri, țesuturile trebuie impregnate după fixare cu material de includere, care le conferă o consistență rigidă. Materialele de includere sunt parafina și rășinile sintetice. Parafina este utilizată în includerea de rutină, iar rășinile sintetice sunt folosite atât în microscopia optică cât și în cea electronică.

Includerea în parafină, sau impregnarea tisulară, este precedată de alte două etape principale: **deshidratarea** și **clarificarea**. În deshidratare, apa este extrasă din țesuturile fixate prin introducerea succesivă a acestora în amestecuri seriate de etanol și apă (având de obicei concentrații succesive de la 70% la 100% etanol). Etanolul este apoi înlocuit de un solvent organic, miscibil atât cu alcoolul cât și cu mediul de includere. Pe măsură ce solventul pătrunde în țesuturi, acestea devin din ce în ce mai transparente (de unde și termenul de clarificare). Țesutul clarificat complet este plasat apoi în parafină topită într-un termostat la temperatura de  $52\text{-}60^{\circ}\text{C}$ . La această temperatură, solventul de clarificare se evaporă, iar țesutul se impregnează cu parafină lichidă. Țesutul impregnat se solidifică într-un recipient mic cu parafină la temperatura camerei. Deshidratarea în etanol se realizează și în cazul țesuturilor care urmează să fie incluse în rășini sintetice, iar ulterior, în funcție de tipul de rășină utilizată, să fie impregnate cu un solvent sintetic. Etanolul sau solventii sunt înlocuiți ulterior cu soluții sintetice, care se solidifică la adăosul de polimerizatori ce formează legături încrucișate. Includerea în rășini sintetice împiedică ratatinarea tisulară indusă de temperaturile crescute necesare includerii în parafină.

Un bloc solid care conține țesut și parafină este introdus în aparatul numit **microtom** (Fig. 1-1) și secționat cu o lamă de otel în secțiuni foarte subțiri. Secțiunile de parafină au în general o grosime de  $1\text{-}10 \mu\text{m}$ , în timp ce cuțitul din sticlă sau din diamant al ultramicrotomului produce secțiuni mai subțiri de  $1 \mu\text{m}$ , pentru microscopia electronică. Un micron ( $1 \mu\text{m}$ ) reprezintă  $1/1000$  dintr-un milimetru (mm) sau  $10^{-6}\text{m}$ . Alte unități de măsură a lungimii utilizate în histologie sunt nanometrul ( $1\text{nm}=0,001\mu\text{m}=10^{-6}\text{mm}=10^{-9}\text{m}$ ) și angstromul ( $1\text{\AA}=0,1\text{nm}$  sau  $10^{-10}\mu\text{m}$ ). Secțiunile foarte subțiri sunt fie așezate pe lame de sticlă și apoi colorate pentru microscopia optică, fie pe grile speciale pentru colorarea și examinarea la microscopul electronic.

## » APICABILITATE MEDICALĂ

Biopsiile sunt fragmente tisulare recoltate în timpul intervențiilor chirurgicale sau al procedurilor medicale de rutină. În sala de chirurgie sau centrele medicale, probele biopsice sunt fixate în recipiente cu formol pentru procesare și analiză ulterioară într-un laborator de anatomie patologică. Dacă rezultatele acestui tip de analiză sunt necesare înainte de încheierea procedurii medicale, de exemplu pentru a ști eventuala natură malignă a unei tumorii în timpul operației, se utilizează o metodă mult mai rapidă. Fragmentul biopsic este rapid înghețat în azot lichid, păstrând structurile celulare și în același timp solidificând și pregătind țesutul pentru secționare. Un tip de microtom denumit **crotom** (sau criostat-microtom), într-o incintă cu temperatură sub cea de îngheț, se utilizează pentru secționarea blocului în care este inclus țesutul, iar secțiunile înghețate sunt apoi așezate pe lame pentru o colorare rapidă și examinare microscopică de către un patolog.

Înghețarea țesuturilor este eficientă și în studiul histochemical al enzimelor foarte sensibile sau al moleculelor mici, întrucât înghețarea, spre deosebire de fixare, nu inactivizează majoritatea enzimelor. În plus, deoarece solventii de clarificare de tipul toluenului dizolvă lipidele celulare din țesuturile fixate, secțiunile înghețate sunt de asemenea utile atunci când structurile care conțin lipide urmează a fi studiate histologic.

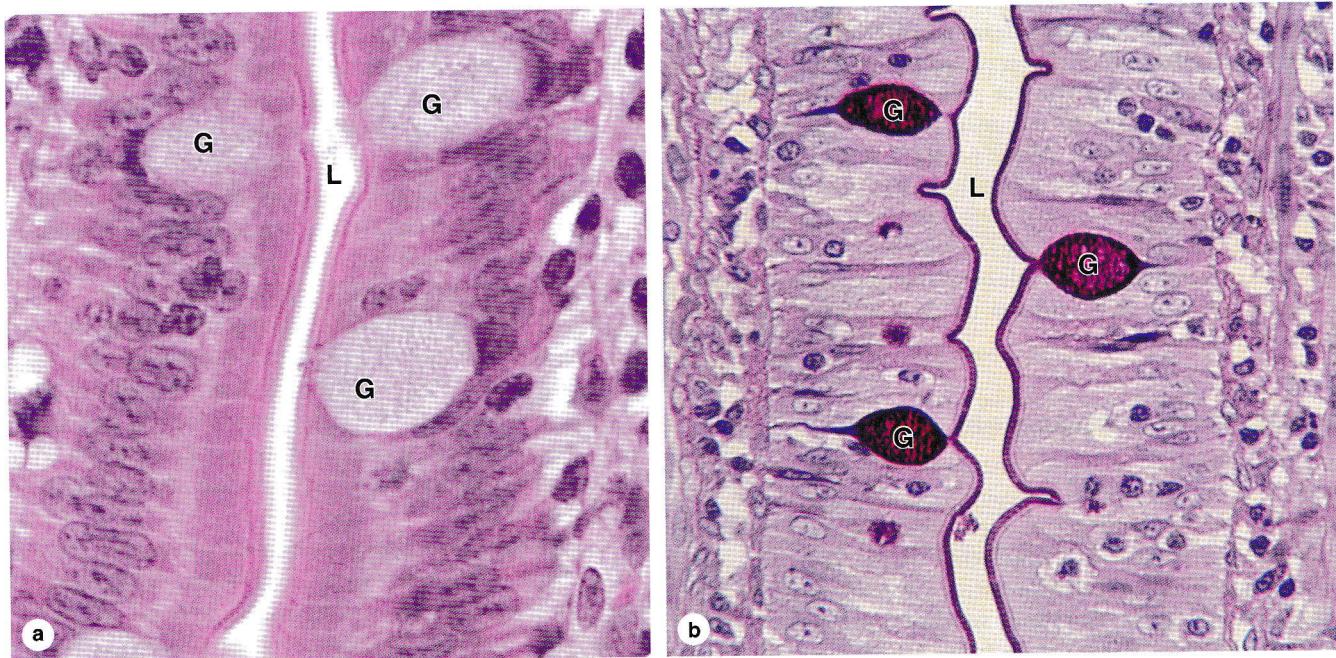
## Colorarea

Majoritatea celulelor și a materialului extracelular sunt complet lipsite de culoare, iar pentru a fi studiate la microscop secțiunile trebuie colorate specific. Metodele de colorare au fost concepute astfel încât nu doar pun în evidență diferențe componente tisulare, dar permit și să se facă distincție între acestea. Coloranții evidențiază elementele tisulare mai mult sau mai puțin selectiv, mulți dintre aceștia se comportă precum compuși acizi sau bazici, formând legături electrostatice cu radicalii ionici (săruri) ai moleculelor din țesuturi. Componentele celulare cum ar fi acizii nucleici cu sarcină electrică net negativă (anionică) se colorează mult mai ușor cu coloranți bazici și sunt denumite **bazofile**; componente cationice, cum ar fi proteinele cu numeroase grupări ionizate amino, au afinitate pentru coloranții acizi și sunt denumite **acidofile**.

Exemple de coloranți bazici sunt albastru de toluidină, albastru alcian și albastru de metilen. Hematoxilina se comportă ca un colorant bazic, colorând componente tisulare bazofile. Principalele componente tisulare care ionizează și reacționează cu coloranții bazici se comportă astfel datorită acizilor din compozitia lor (ADN, ARN și glicozaminoglicani). Coloranții acizi (e.g. eozina, oranž G și fucsina acidă) colorează componentele acidofile ale țesuturilor, cum ar fi mitocondriile, granulele secretorii și colagenul.

Dintre toate metodele de colorare, combinația simplă dintre **hematoxilină și eozină (H&E)** este cel mai frecvent folosită. Hematoxilina produce o culoare albastru închis sau violet, colorând ADN-ul în nucleul celular și alte structuri acide (cum

FIGURA 1–2 Colorații hematoxilină-eozină (H&amp;E) și acid periodic-Schiff (PAS).



Imagine microscopică a epitelului ce căptușește intestinul subțire, (a) colorată cu H&E, și (b) colorată prin metoda PAS pentru glicoproteine. Cu H&E, nucleii bazofili ai celulelor sunt colorați în violet, în timp ce citoplasma se colorează în roz. Reuniunile celulare cu glicoproteine abundente în oligozaharide – cum ar fi suprafețele celulare dinspre lumen (L) sau celulele caliciforme (G, goblet) secretoare de mucus, dispuse – sunt slab colorate. Cu PAS însă, colorația celulelor este cea mai

intensă către lumen (L), înspite care microvilli prezintă un strat important de glicoproteine, și în granulele secretorii bogate în mucină ale celulelor caliciforme. Glicoproteinele suprafetei celulare și mucina sunt PAS-pozitive datorită conținutului lor ridicat de oligozaharide, și respectiv, polizaharide. Tesutul colorat cu PAS a fost contrastat cu hematoxilină, pentru evidențierea nucleilor celulaři.  
(a) și (b) x300.

sunt zonele bogate în ARN ale citoplasmei și matricei cartilajului). Pe de altă parte, eozina colorează alte componente citoplasmatic și colagenul în roz (Fig. 1-2a). Alte colorații, ca cele tricrome (e.g. Mallory, Masson) sunt utilizate în proceduri histologice mai complexe. Colorațiile tricrome, pe lângă evidențierea foarte bună a nucleilor și a citoplasmei, ajută la distingerea componentelor tisulare extracelulare mai bine decât H&E.

Bazele chimice ale altor tehnici de colorare sunt mult mai complicate decât interacțiunile electrostatice ce susțin acidofilia și bazofilia. ADN-ul poate fi identificat specific și cuantificat în nuclei cu ajutorul reacției Feulgen, în care zaharurile de tipul deoxiribozei sunt hidrolizate de acid clorhidric slab, urmat de tratamentul cu **acid periodic și reactiv Schiff (PAS)** (*n.ed.: denumirea vine de la iod, nu de la perioadă, per+iodic*). Această reacție PAS se bazează pe transformarea grupărilor 1,2-glicol, prezente în zaharuri, în resturi aldehidice, care reacționează apoi cu reactivul Schiff rezultând o culoare purpuriu-vișinie.

Polizaharidele constituie un grup eterogen în țesuturi, apărând fie în stare liberă, fie legate de proteine și lipide. Datorită conținutului lor în hexoze, numeroase polizaharide pot fi evidențiate de asemenea prin metoda PAS. **Glicogenul** este un polizaharid liber foarte întâlnit în celula animală, care poate fi pus în evidență prin metoda PAS în ficat, mușchi striat și în alte țesuturi unde se acumulează.

Lanțuri ramificate scurte de zaharuri (oligozaharide) sunt atașate de aminoacizi specifici ai **glicoproteinelor**, astfel încât majoritatea glicoproteinelor sunt PAS-pozitive. Figura 1-2b prezintă un exemplu de celule colorate prin metoda PAS. **Glicoaminoglicanii** (GAG) sunt polizaharide anionice, cu lanț lung, neramificat, ce conțin zaharuri amină. Numeroși GAG sunt sintetizați fiind atașați unui miez proteic și fac parte dintr-o clasă de macromolecule denumite **proteoglicani**, care după secreție alcătuiesc părți importante ale MEC (vezi Capitolele 5 și 7). GAG și numeroase glicoproteine acide nu participă la reacția PAS, dar datorită conținutului lor ridicat de carboxil anionic și grupării sulfat, prezintă o interacțiune electrostatică puternică cu albastru alcian și alți coloranți bazici.

Elementele bazofile sau PAS-pozitive pot fi identificate și prin **digestie enzimatică** – tratarea în prealabil a unei secțiuni tisulare cu o enzimă care digeră specific un anumit substrat. De exemplu, tratarea prealabilă cu ribonuclează va reduce considerabil bazofilia citoplasmatică cu un efect minim asupra nucleului, indicând importanța ARN pentru colorarea citoplasmei. În mod similar, polizaharidele libere sunt digerate de o amilază, care poate fi astfel folosită pentru a deosebi glicogenul de glicoproteine în secțiunile sau structurile PAS-pozitive.

În numeroase protocoale de colorare, anumite structuri, cum ar fi nucleii, devin vizibile, dar alte componente ale celulelor

ținând incolor. În astfel de cazuri, se folosește o **colorare contrastantă** pentru a obține informații suplimentare. O colorație contrastantă este de obicei o colorație simplă care se aplică separat pentru a permite o recunoaștere mai bună a nucleilor și a altor structuri. În colorația H&E, eozina este colorantul contrastant pentru hematoxilină.

Structurile celulare bogate în lipide sunt puse cel mai bine în evidență de coloranți liposolubili și prin evitarea etapelor de procesare care ar îndepărta lipidele (e.g. tratarea cu căldură, solvenți organici sau parafină). În mod obișnuit, secțiunile înghețate sunt colorate în soluții de alcool saturate cu un colorant lipofil, de exemplu **negru Sudan**, care se dizolvă în structurile celulare bogate în lipide. Metodele specifice pentru localizarea colesterolului, a fosfolipidelor și a glicolipidelor sunt utile în diagnosticarea bolilor de metabolism cu acumulații intracelulare ale acestor diferite lipide. Pe lângă colorarea țesuturilor cu coloranți, **tehniciile de impregnare metalică** – care utilizează de obicei soluții de săruri de argint – sunt o metodă obișnuită de evidențiere a unor fibre ale MEC și a unor elemente celulare specifice în țesutul nervos.

Întregul procedeu, de la fixare până la examinarea unui țesut la microscopul optic, poate dura de la 12 ore la 2 zile și jumătate, în funcție de dimensiunea țesutului, fixator, mediul de includere și metoda de colorare. Etapa finală dinaintea examinării la microscop constă în montarea unei lamele de sticlă protectoare pe lamă, cu ajutorul unui adeziv transparent.

## MICROSCOPIA OPTICĂ

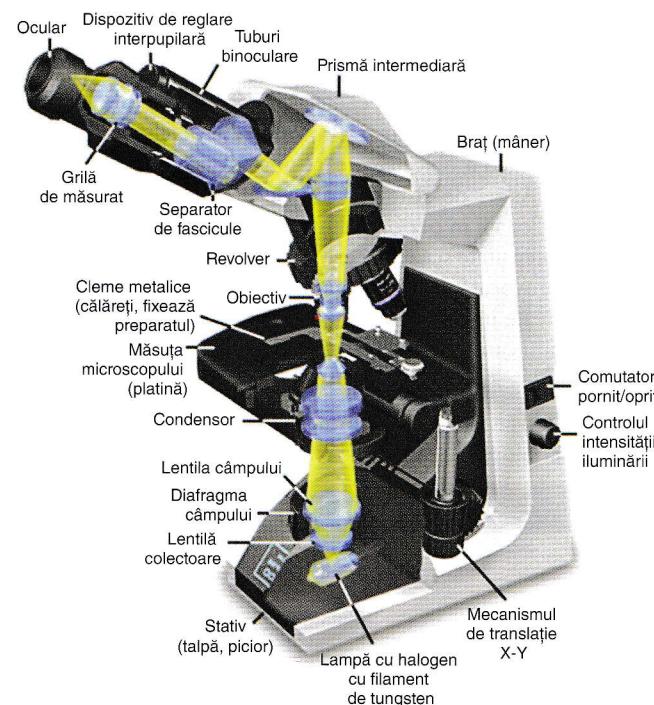
La fel ca și microscopia cu fluorescență, cu contrast de fază, cu interferență diferențială, cea confocală și cea cu lumină polarizată, microscopia convențională în câmp luminos se bazează pe interacțiunea luminii cu componentele tisulare, și toate sunt utilizate pentru a evidenția și studia caracteristicile țesuturilor în diferite moduri.

### Microscopia în câmp luminos

Cu **microscopul cu câmp luminos**, folosit pe larg de studenți la histologie, preparatele colorate sunt examineate cu ajutorul luminii obișnuite, care trece prin secțiune. Microscopul include un sistem optic și mecanisme pentru a mișca și a focaliza preparatul histologic (Fig. 1-3). Componentele optice constau în trei lentile. Lentila **condensor** adună și focalizează un con de lumină care luminează obiectul de observat. Lentila **obiectiv** mărește și proiectează imaginea obiectului în direcția ocularului. Lentila **ocular** mărește și mai mult imaginea, și o proiectează către retina observatorului sau către un senzor CCD (*charge-coupled device*) foarte sensibil la niveluri scăzute de lumină, cu un monitor și un aparat de fotografiat. Puterea de mărire totală se obține prin înmulțirea puterii de mărire a lentilelor obiectiv și ocular.

Factorul decisiv pentru obținerea unei imagini clare și detaliate cu un microscop optic este **puterea de rezoluție** a acestuia, definită drept cea mai mică distanță dintre două particule la care acestea pot fi văzute ca elemente separate. Puterea maximă de rezoluție a microscopului optic este de aproximativ 0,2 µm, o

**FIGURA 1-3 Componentele unui microscop optic cu câmp luminos și traseul luminii prin acesta.**



Fotografia unui microscop optic cu câmp luminos care arată componente mecanice și traseul luminii de la sursa de lumină către ochiul observatorului. Sistemul optic are trei seturi de lentile:

- **Condensorul** adună și focalizează un con de lumină care iluminează lama de pe măsuță.
- Lentilele **obiectivului** măresc și proiectează imaginea iluminată a obiectului către ocular. Obiectivele interschimbabile, cu diferite puteri de mărire, utilizate obișnuit în histologie includ x4 pentru observarea unei suprafețe (câmp) mai mari a țesutului la putere de mărire redusă; x10 pentru o mărire medie a unui câmp mai mic; și x40 pentru o mărire înaltă a unor zone mai detaliate.
- Cele două **oculare** măresc această imagine de încă x10 și o proiectează către observator, rezultând o putere de mărire totală de x40, x100 sau x400.

(Cu permisiunea Nikon Instruments.)

putere care asigură imagini bune la o mărire de 1000-1500 de ori. Elementele mai mici sau mai subțiri de 0,2 µm (e.g. un ribozom, o membrană, sau un filament de actină) nu pot fi deosebite cu acest instrument. La fel, două elemente (cum ar fi mitocondriile) vor fi văzute ca un obiect unic dacă distanța dintre ele este mai mică de 0,2 µm. Calitatea imaginii – claritatea și bogăția detaliilor – depinde de puterea de rezoluție a microscopului. Puterea de mărire este valoroasă doar însoțită de o rezoluție înaltă. Puterea de rezoluție a unui microscop depinde în principal de calitatea lentilei obiectiv. Lentila ocular doar mărește imaginea obținută de obiectiv, nu îmbunătățește rezoluția. Din acest motiv, atunci

când sunt comparate obiective cu puteri de mărire diferite, acelea care au o mărire mai mare, au și o putere de rezoluție mai mare.

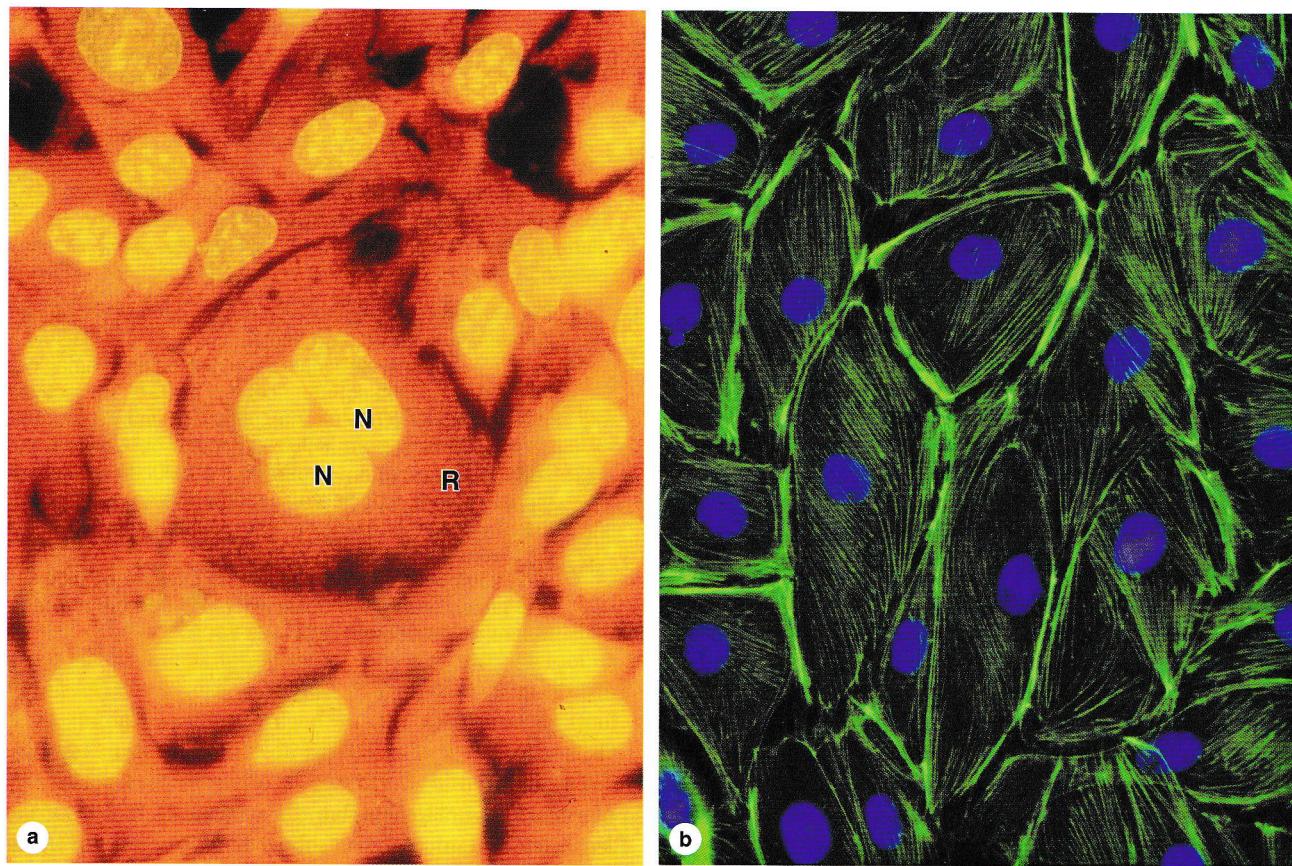
Camerele digitale cu sensibilitate mare la lumină măresc puterea microscopelor cu câmp luminos și a altor microscopioptice, permitând capturarea imaginilor pretabile pentru analiză cantitativă și tipărire imediată. Limitele microscopiei optice au fost redefinite prin utilizarea camerelor digitale, iar programele de îmbunătățire a imaginii (e.g. a contrastului) facilitează analiza pe un ecran video a obiectelor care pot să nu fie direct vizibile prin ocular. Astfel de sisteme sunt de asemenea utile pentru studiul celulelor vii în perioade lungi de timp, deoarece folosesc lumină de intensitate scăzută, care evită lezarea celulelor cauzată de căldura provocată de o iluminare mai intensă. Programele de calculator create în vederea analizei imaginii permit măsurători rapide și studii cantitative ale structurilor microscopice.

## Microscopia cu fluorescență

Atunci când anumite substanțe celulare sunt iradiate cu o lumină având o lungime de undă corespunzătoare, ele emit o lumină cu o lungime de undă mai mare – fenomen numit **fluorescență**. În **microscopia cu fluorescență**, secțiunile tisulare sunt de obicei iradiate cu lumină ultravioletă (UV), iar emisia este în porțiunea vizibilă a spectrului. Substanțele fluorescente apar strălucitoare pe un fond întunecat. Pentru această metodă, microscopul are o sursă puternică de lumină UV și filtre speciale care selectează razele cu diferite lungimi de undă emise de substanțe.

Compușii fluorescenti cu afinitate pentru macromolecule celulare specifice pot fi utilizati drept coloranți fluorescenti. Acridina oranž, care leagă atât ADN cât și ARN, este un astfel de exemplu. Când sunt examinați la microscopul cu fluorescență, acești acizi nucleici emit o lumină fluorescentă ușor diferită, permitând să fie localizați separat în celule (Fig. 1-4a). Alți compuși, cum ar fi DAPI sau colorantul Hoechst, leagă specific

**FIGURA 1–4 Aspectul celulelor în microscopia cu fluorescență.**



Componentele celulare sunt adesea colorate cu compuși vizibili în microscopia cu fluorescență

(a) Acridina oranž leagă acizi nucleici și determină ADN-ul din nucleii celulare (N) să emite lumină galbenă, iar citoplasma bogată în ARN (R) să apară portocalie în aceste celule ale unui tub renal.

(b) Celule în cultură colorate cu DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), care leagă ADN, și cu fluorescein-faloidină, care

leagă filamentele de actină; evidențiază nucleii în albastru fluorescent și filamentele de actină colorate în verde. Se disting informații importante, cum ar fi densitatea crescută de microfilamente la periferia celulei.

(a) și (b) x500.

(Figura 1-4b, contribuție cu permisiunea Dr. Claire E. Walczak și Dr. Rania Risk, Indiana University School of Medicine, Bloomington.)

ADN și sunt folosiți pentru a colora nucleii celulares, emițând o lumină fluorescentă albastră caracteristică la stimularea cu UV. O altă aplicație importantă a microscopiei cu fluorescență este realizată prin cuplarea compușilor de tipul fluoresceinei la molecule care se vor lega specific de anumite componente celulare și vor permite astfel identificarea acestora la microscop (Fig. 1-4b). Anticorpii marcați cu compuși fluorescenti sunt extrem de importanți în colorațiile imunohistochimice. (Vezi secțiunea despre vizualizarea moleculelor specifice.)

### Microscopia cu contrast de fază

Celulele și secțiunile tisulare necolorate, care sunt de obicei transparente și incolore, pot fi studiate cu aceste microscopiope optice modificate. Detaliile celulare sunt în mod normal dificil de observat în țesuturile necolorate, deoarece toate părțile preparatului au densități optice aproximativ similare. Cu toate acestea, **microscopia cu contrast de fază** utilizează un sistem de lentile care produce imagini vizibile din obiecte transparente și care poate fi folosit pentru celule vii, în cultură (Fig. 1-5).

Microscopia cu contrast de fază se bazează pe principiul conform căruia lumina își modifică viteza atunci când trece prin componentele celulare și extracelulare cu indici de refracție diferiți. Aceste modificări sunt folosite de sistemul cu contrast de fază pentru a face ca elementele să apară mai luminoase sau mai întunecate în comparație unele cu altele. Deoarece acestea permit examinarea celulelor fără fixare sau colorare, microscopioapele cu contrast de fază sunt instrumente importante în toate

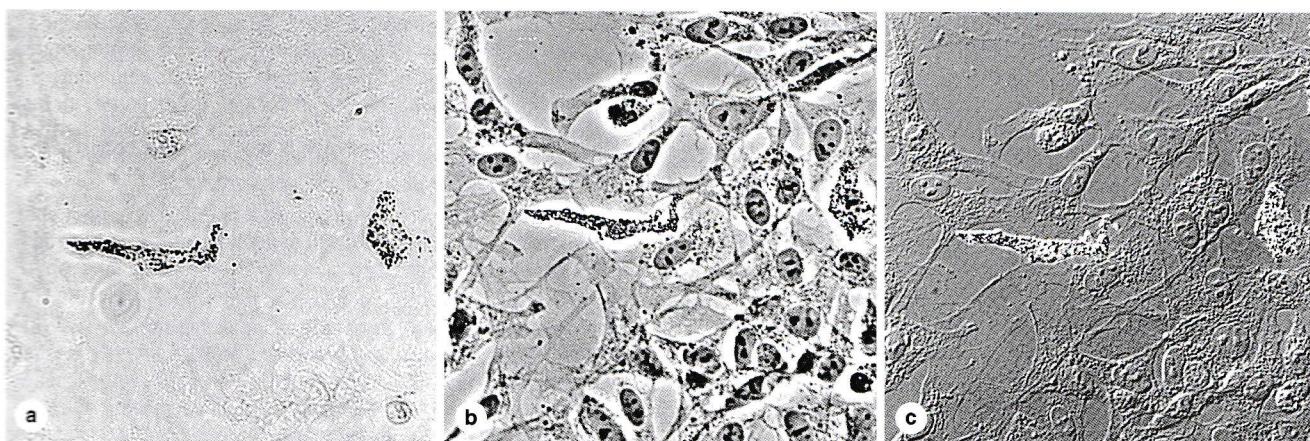
laboratoarele de culturi celulare. O modificare a microscopiei cu contrast de fază este **microscopia cu interferență diferențială** cu sistem optic Nomarski, care produce o imagine a celulelor vii, cu un aparent aspect tridimensional (3D) (Fig. 1-5c).

### Microscopia confocală

În cazul unui microscop optic cu câmp luminos, fasciculul de lumină este relativ larg și cuprinde preparatul. Lumina pierdută (în exces) scade contrastul imaginii și compromite puterea de rezoluție a lentilei obiectiv. Microscopia confocală (Fig. 1-6) evită aceste probleme și asigură o rezoluție înaltă și o focalizare precisă prin utilizarea (1) unui fascicul punctual de lumină cu intensitate crescută, adesea de la un laser, și (2) unei plăcuțe cu un orificiu îngust în fața detectorului de imagine. Sursa fasciculului punctual de lumină, focalul lentilei și orificiul îngust al plăcuței sunt toate conjugate optic sau aliniate una față de cealaltă în planul focal (confocal), iar lumina nefocalizată nu trece prin orificiu. Aceasta îmbunătățește semnificativ rezoluția obiectului focalizat și permite localizarea componentelor preparatului cu o precizie mult mai mare comparativ cu microscopul optic cu câmp luminos.

Microscopioapele confocale includ un sistem de oglinzi reglat de un computer (separatatorul de fascicule) pentru a mișca automat și rapid punctul de iluminare de-a lungul preparatului. Imaginele digitale capturează în numeroase puncte individuale într-un plan focal foarte subțire sunt folosite pentru a produce o „secțiune optică” a aceluia plan. Crearea unor astfel de secțiuni optice

**FIGURA 1–5** Aspectul celulelor necolorate în trei tipuri de microscopie optică.



Cultură de celule din creasta neurală, vizualizate prin diferite tehnici de microscopie optică. Aici este prezentat același câmp de celule necolorate, incluzând două celule pigmentare în diviziune, folosind trei metode diferite (toate la mărirea x200):

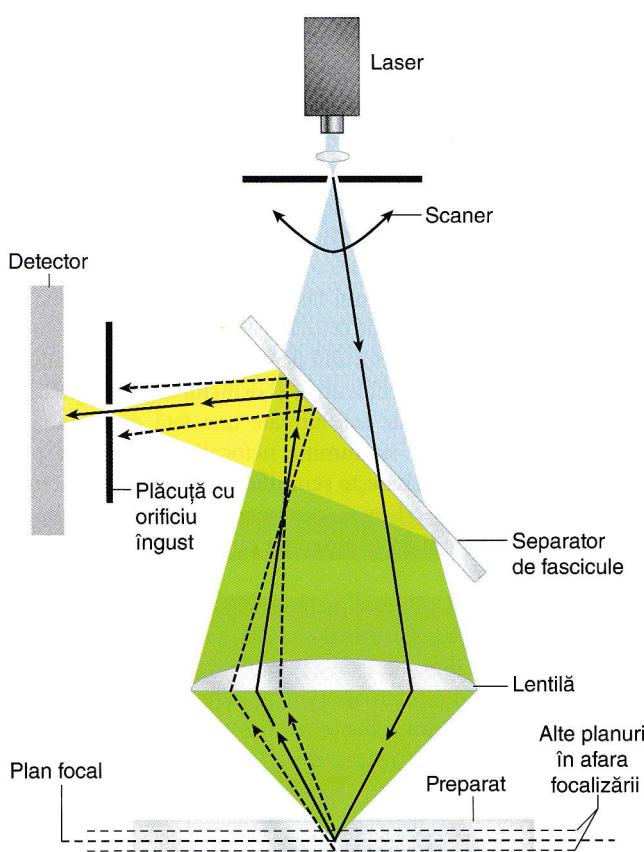
(a) **Microscopia cu câmp luminos:** Fără fixare și colorare, pot fi văzute numai cele două celule pigmentare.

(b) **Microscopia cu contrast de fază:** Limitele celulare, nuclei și structurile citoplasmatiche cu indici de refracție diferiți afectează diferit lumina în fază și produc o imagine a acestor elemente în toate celulele.

(c) **Microscopia cu interferență diferențială:** Detaliile celulare sunt evidențiate într-o manieră diferită utilizând un sistem optic de tip Nomarski. Microscopia cu contrast de fază, cu sau fără interferență diferențială, este larg utilizată pentru a observa celule vii crescute în culturi tisulare.

(Cu permisiunea Dr. Sherry Rogers, Department of Cell Biology and Physiology, University of New Mexico, Albuquerque, NM.)

**FIGURA 1–6 Principiul microscopiei confocale.**



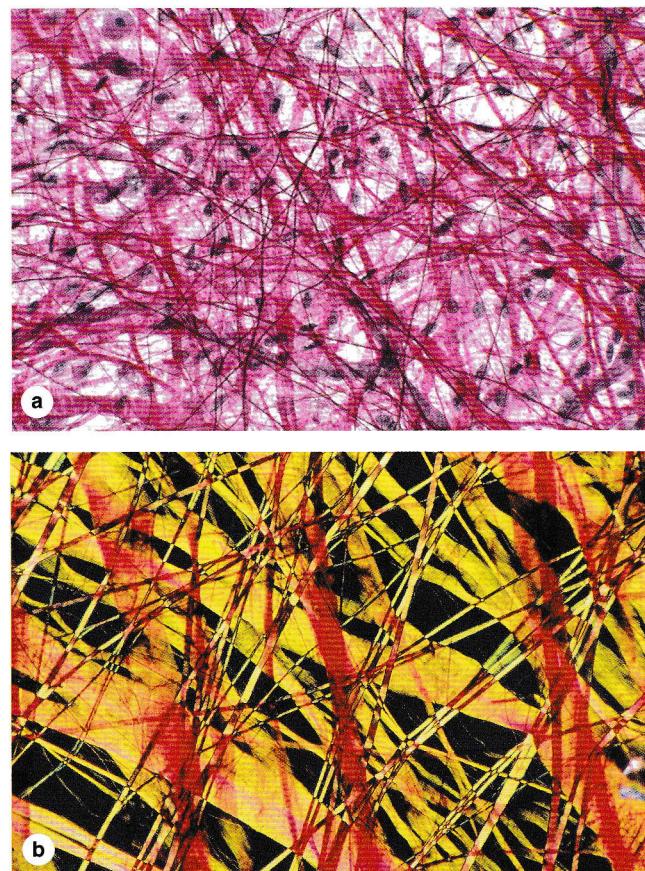
Deși un spot foarte mic de lumină cu originea la nivelul unui plan de secțiune traversează orificiul îngust și ajunge la detector, razele cu originea în alte planuri sunt blocate complet. Astfel, un singur plan foarte subțire al preparatului este focalizat la un moment dat. Schema prezintă configurația unui microscop confocal. Lumina provenind de la o sursă laser ajunge la preparat și este reflectată. Un separator de fascicule orientează lumina reflectată către orificiul îngust și detector. Lumina provenind de la componentele preparatului aflate deasupra sau dedesubtul planului focal este blocată complet. Laserul scanează suprafața preparatului pentru a permite observarea unei suprafețe mari din acesta.

într-o serie de planuri focale prin preparat permite reconstrucția digitală a acestora într-o imagine 3D.

### Microscopia cu lumină polarizată

Microscopia cu lumină polarizată permite recunoașterea elementelor colorate sau necolorate alcătuite din subunități foarte bine organizate. Atunci când lumina obișnuită trece printr-un filtru **de polarizare**, ieșe vibrând într-o singură direcție. Dacă un al doilea filtru este așezat în microscop deasupra primului, cu axa principală perpendiculară pe primul filtru, lumina nu va trece. Cu toate acestea, dacă elemente tisulare conținând macromolecule orientate sunt localizate între cele două filtre polarizante, structura lor repetitivă va roti axa luminii provenite din polarizor și acestea vor apărea ca structuri luminate, în

**FIGURA 1–7 Aspectul țesutului în microscopia cu câmp luminos și în microscopia cu lumină polarizată.**



Microscopia cu lumină polarizată produce o imagine doar a materialului ce conține structuri macromoleculare repetitive, periodice; elementele fără o astfel de structură nu sunt vizibile. Fragmente de mezenter subțire, nesectionat, au fost colorate cu roșu picrosirius, orceină și hematoxilină, așezate pe lame de microscop și observate prin microscopie cu câmp luminos (a) și cu lumină polarizată (b).

(a) În microscopia cu câmp luminos, fibrele de colagen apar roșii, iar fibrele elastice subțiri și nuclei celulelor apar mai întunecate.

(b) În microscopia cu lumină polarizată sunt vizibile doar fibrele de colagen: acestea manifestă o intensă birefringență galbenă sau portocalie (a: x40; b: x100).

contrast cu un fundal întunecat (Fig. 1-7). Capacitatea de a roti direcția vibrației luminii polarizate se numește **birefringență** și este o caracteristică a substanțelor cristaline sau a celor care conțin molecule puternic orientate, cum ar fi celuloza, colagenul, microtubulii și filamentele de actină.

## MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

Microscopioapele electronice de transmisie și cu scanare se bazează pe interacțiunea componentelor tisulare cu fascicule de electroni. Lungimea de undă a fasciculului de electroni este mult mai scurtă decât cea a luminii, permitând o creștere de 1000 ori a rezoluției.

## Microscopia electronică de transmisie

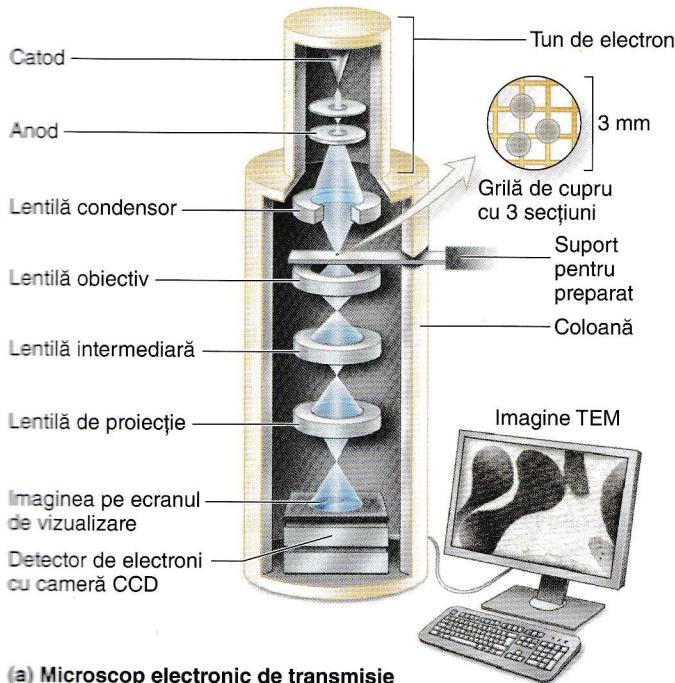
**Microscopul electronic de transmisie (TEM)** este un sistem imagistic cu putere de rezoluție în jur de 3 nm. Această rezoluție înaltă permite vizualizarea în detaliu a imaginilor mărite de până la 400.000 de ori. Totuși, acest nivel de mărire poate fi obținut numai în cazul macromoleculelor sau particulelor izolate. Secțiunile tisulare foarte subțiri pot fi observate în detaliu prin mărirea imaginii de până la 120.000 de ori.

Așa cum este prezentat în Fig. 1-8a, în TEM filamentul metalic al catodului emite electroni care se mișcă înspre un

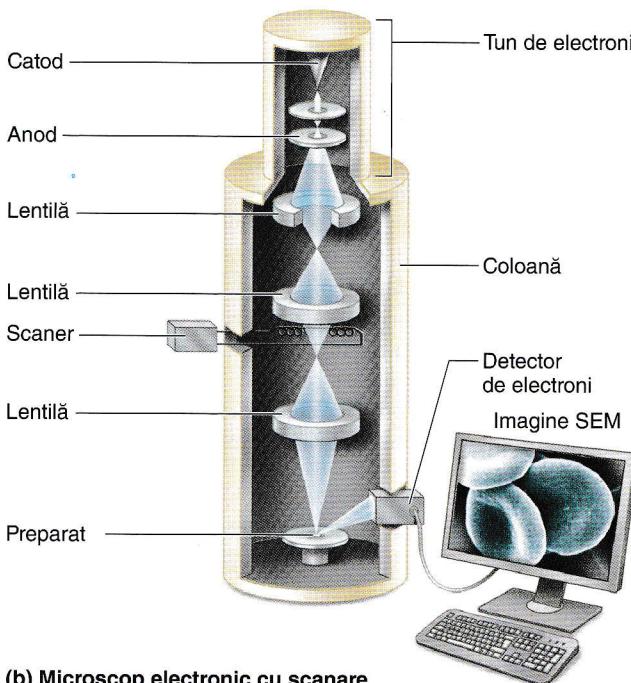
anod – o placă metalică cu un orificiu central, care formează un fascicul de electroni ce trece prin ea. Diferența de tensiune dintre catod și anod poate varia între aproximativ 60 și 120 kV, producând fascicule de electroni cu diferite lungimi de undă. Fascicul este focalizat la trecerea prin electromagneti, a căror putere este de asemenea variabilă.

Prima lentilă este un condensor care focalizează fasciculul de electroni pe o secțiune a preparatului. Unii electroni interacționează cu atomii din secțiune și traiectoria lor este modificată, în timp ce alții traversează pur și simplu preparatul fără a interacționa. Electronii transmiși prin preparat ajung

FIGURA 1-8 Microscopele electronice.



(a) Microscop electronic de transmisie



(b) Microscop electronic cu scanare

Microscopele electronice sunt instrumente de mari dimensiuni, prezente de obicei în departamente specializate de microscopie electronică.

**(a) Imagine schematizată a principalelor componente ale unui microscop electronic de transmisie (TEM), care este alcătuit asemănător unui microscop optic răsturnat.** În condiții de vid în coloana microscopului, un filament metalic, de obicei din tungsten, situat superior – catodul – emite electroni care se deplasează către anod cu o tensiune de accelerare cuprinsă între 60 și 120 kV. Electronii trec printr-un orificiu din anod și formează un fascicul care este focalizat electromagnetic de bobine electrice circulare într-un mod analog efectelor lentilelor optice asupra luminii.

Prima lentilă este un condensor, focalizând fasciculul pe secțiune. Unii electroni interacționează cu atomii din secțiune, fiind absorbiți sau împăraștiți în diferite proporții, în timp ce alții sunt doar transmiși prin preparat fără vreo interacțiune. Electronii care ajung la lentila obiectiv formează o imagine care este apoi mărită și în final proiectată pe un ecran fluorescent sau pe un dispozitiv CCD cu monitor și cameră.

Într-o imagine TEM, zonele preparatului prin care electronii au trecut apar luminoase (electrono-clare), iar zonele mai dense, sau cele care au legat ioni de metale grele în timpul pregătirii preparatului, absorb sau reflectă electronii și apar mai întunecate (electrono-dense). Astfel de imagini sunt aşadar întotdeauna albe, negre și în nuanțe de gri.

**(b) Microscopul electronic cu scanare (SEM)** are multe asemănări cu un TEM. Cu toate acestea, aici fasciculul focalizat de electroni nu trece prin preparat, ci este baleiat succesiv (scanat) de-a lungul suprafeței preparatului, similar modului în care un fascicul de electroni este deplasat de-a lungul unui tub de televizor sau ecran. Pentru SEM, preparatele sunt acoperite cu atomi de metal cu care fasciculul de electroni interacționează, producând electroni reflectați și electroni secundari nou emisi. Toți aceștia sunt captăți de un detector, transmiși unor amplificatori și procesați pentru producerea unei imagini alb-negru pe monitor. SEM furnizează numai imagini ale suprafețelor preparatului (acoperit cu ioni metalici), dar cu un aspect particular 3D, cu unele umbre. Interiorul organelor sau al celulelor poate fi analizat după secționarea în scopul expunerii suprafețelor lor interne.

la lentila obiectiv, formează o imagine focalizată, mărită, care este apoi mărită și mai mult prin alte lentile și proiectată pe un ecran de vizualizare. Imaginea preparatului prezintă zone de alb, negru și nuanțe de gri, corespunzătoare teritoriilor prin care electronii au trecut ușor (apar luminoase sau electrono-clare) și teritorii unde electronii au fost absorbiți sau reflectați (apar mai întunecate sau electrono-dense). Pentru a îmbunătăți contrastul și rezoluția în TEM, sunt adăugați compuși cu **ioni de metale grele** în soluțiile de fixare sau de deshidratare utilizate la pregătirea țesutului. Aceste soluții includ tetraoxid de osmu, citrat de plumb și compuși de uranil, care leagă macromoleculele celulare, crescându-le densitatea electronică și vizibilitatea.

TEM necesită în mod normal secțiuni foarte subțiri (40-90 nm); de aceea țesutul este inclus într-o răsină epoxidică dură și secționat cu un cuțit de sticlă sau de diamant. Secțiunile sunt colectate pe grile metalice mici, care sunt plasate în coloana microscopului pentru analiză.

**Crio fracturarea și corodarea prin înghețare** (*freeze etching*) sunt tehnici care permit studiul celulelor prin TEM, fără fixare sau includere. Crio fracturarea a fost utilă în special în studiul structurii membranei. În aceste metode, probe foarte mici de țesut sunt înghețate rapid în azot lichid și apoi fie fracturate, fie tăiate cu un cuțit. O replică a suprafeței înghețate expuse este realizată în vid prin aplicarea unor straturi subțiri de platină vaporizată sau de alți atomi metalici. După îndepărțarea materialului organic, replica suprafeței tăiate poate fi examinată prin microscopie electronică. În cazul membranelor, planurile aleatoare de fractură împart adesea bistraturile lipidice, expunând componente proteice ale căror dimensiuni, forme și distribuție ar fi dificil de studiat prin alte metode.

## Microscopia electronică cu scanare

Microscopia electronică cu scanare (SEM) oferă o imagine de înaltă rezoluție a suprafețelor celulelor, țesuturilor și organelor. La fel ca TEM, acest microscop produce și focalizează un fascicul foarte ingust de electroni, dar în acest instrument fasciculul nu trece prin preparat (Fig. 1-8b). În schimb, suprafața preparatului este mai întâi uscată și acoperită prin pulverizare cu o peliculă foarte subțire de metal greu (frecvent aur) prin care electronii nu trec ușor. Când fascicul este baleiat de la un punct la altul de-a lungul preparatului, interacționează cu atomii metalului și produce electroni reflectați sau electroni secundari emisi din metal. Aceștia sunt captați de un detector, iar semnalul rezultat este procesat pentru a produce o imagine alb-negru pe un monitor. Imaginele SEM sunt de obicei ușor de interpretat deoarece prezintă un aspect 3D care pare a fi iluminat de sus, în același mod în care obiectele macroscopice obișnuite sunt văzute cu lumini și umbre date de o lumină de deasupra.

## AUTORADIOGRAFIA

**Autoradiografia** microscopică este o metodă de localizare a macromoleculelor nou sintetizate (ADN, ARN, proteine, glicoproteine și polizaharide) în celule sau secțiuni tisulare. Metabolii marcați radioactiv (nucleotide, aminoacizi, zaharuri) încorporați în macromolecule emit o radiație slabă, restrânsă

la regiunile specifice unde sunt localizate moleculele. Preparate cu celule sau secțiuni tisulare marcate radioactiv sunt acoperite într-o cameră obscură cu emulsie fotografică ce conține cristale de bromură de argint, care acționează ca microdetectori ai radiației în același mod în care răspund la lumină în filmul fotografic. După un timp de expunere adecvat în recipiente opace, se realizează developarea fotografică. Cristalele de bromură de argint sunt transformate în mici granule de argint, de culoare neagră, care indică localizarea în țesut a macromoleculelor marcate radioactiv (se vizualizează atât în microscopie optică, cât și în TEM) (Fig. 1-9).

Prin autoradiografia celulelor sau țesuturilor se obțin numeroase informații. Dacă este folosit un precursor radioactiv al ADN (cum ar fi timidina marcată cu tritium), este posibilă identificarea celulelor dintr-un țesut (și a numărului lor) în care are loc replicarea ADN și care se pregătesc de diviziune. De asemenea, pot fi analizate și fenomene dinamice. De exemplu, pentru a identifica regiunea celulară în care este sintetizată o proteină, dacă aceasta este secretată, și care este traseul ei în celulă înainte de a fi secretată, se injecteză un aminoacid radioactiv la mai multe animale, iar țesuturile sunt recoltate după intervale diferite de la injectare. Autoradiografiile țesuturilor recoltate secvențial vor indica migrarea proteinelor radioactive.

## CULTURILE DE CELULE ȘI ȚESUTURI

Celulele și țesuturile vii pot fi menținute și studiate în afara organismului în cultură (*in vitro*). În interiorul organismului (*in vivo*), celulele sunt înconjurate de un fluid derivat din plasma sanguină, ce conține numeroase molecule diferite, necesare pentru supraviețuire și creștere. Cultura de celule este neprețuită în studierea funcțiilor acestor molecule. Multe experimente imposibil de efectuat tehnic la animalul viu pot fi reproduse *in vitro*.

Celulele și țesuturile sunt cultivate în soluții complexe cu compozиție cunoscută (săruri, aminoacizi, vitamine), la care se adaugă componente serice sau factori specifici de creștere. În pregătirea culturilor dintr-un țesut sau organ, celulele trebuie dispersate mecanic sau enzimatic. Odată izolate, celulele pot fi cultivate într-un vas transparent, de care aderă de obicei în monostrat (Fig. 1-5). Culturile formate din celule izolate astfel sunt denumite **culturi celulare primare**. Numeroase tipuri celulare, odată izolate din țesuturi normale sau patologice, pot fi menținute *in vitro* pentru perioade lungi întrucât devin imortalizate și constituie o **linie celulară permanentă**. Majoritatea celulelor obținute din țesuturi normale au o durată de viață finită, programată genetic. Însă anumite modificări (unele legate de oncogene; vezi Capitolul 3) pot conduce la dobândirea imortalității celulei, proces numit **transformare**, și sunt asemănătoare cu modificările inițiale dintr-o celulă normală pe cale de a deveni celulă canceroasă. În prezent, datorită progreselor tehnologiei culturilor de celule, majoritatea tipurilor celulare pot fi păstrate viabile în laborator. Toate procedurile care implică celule și țesuturi vii trebuie efectuate într-un mediu steril, folosind soluții și echipamente sterile, pentru a evita contaminarea cu microorganisme.