TEHNICA HISTOPATOLOGICĂ

Redactată de :

DR. GH. DIACONIȚĂ, DR. AL. ESKENASY, CONF. DR. A. HAGI-PARASCHIV, DR. G. ILIESCU, CONF. DR. AUG. MUREȘANU, DR. P. NICOLESCU, PROF. DR. E. REPCIUC, DR. VALENTINA ROȘCA ȘI PROF. DR. A. TEITEL

EDITURA DE STAT
PENTRU LITERATURĂ ȘTIINȚIFICĂ
BUCUREȘTI
1953

CUVÂNT INAINTE

Actul revoluționar al unificării spitalelor cu policlinicile a însemnat o cotitură importantă în ridicarea calificării profesionale a cadrelor noastre medicale. Impunând cercetării medicale clinice și de laborator o orientare cu totul nouă, cerând practicii verificarea datelor teoretice și introducând indicii de calitate în munca de spital, unificarea a creat anatomiei patologice noi condiții de desvoltare, făcând din prosectura și laboratorul de anatomie patologică un factor important în munca de calificare a cadrelor medicale.

Experiența Uniunii Sovietice ne învață că, în munca spitalicească, prosectura și laboratorul de histopatologie reprezintă un centru științific important care colaborează cu toate serviciile spitalicești, contribuind activ la stabilirea și confirmarea diagnosticului clinic, permițând astfel orientarea viitoare a terapeuticii în cazurile similare. In Uniunea Sovietică, prosecturile și laboratoarele de histopatologie din spitale sunt conduse de specialiști competenți, cu o vastă pregătire teoretică și practică.

Noile bareme de încadrare a spitalelor noastre prevăd existența medicului anatomopatolog.

Necesitatea acestui specialist în munca spitalicească se confirmă din ce în ce mai frecvent. Diagnosticul pre-, intra- și postoperator al cancerului este astăzi în mod practic imposibil în absența histopatologului.

Există credința că orice om care privește în microscop este un histopatolog competent. Această credință este însă cât se poate de departe de realitate și extrem de dăunătoare bolnavului. Nu numai că nu orice microscopist este și histolog, dar nici măcar orice histolog nu este histopatolog.

Histopatologul este în același timp și histolog și medic. El cunoaște histologia normală a omului, nu numai pentrucă a învățat-o din cărți, dar pentrucă a studiat-o pe secțiuni din țesuturi omenești. Histopatologul este dotat astfel cu elementele de comparație convenabile. El cunoaște leziunile în multiplicitatea infinită a aspectelor lor, el cunoaște evoluția lor, într'un cuvânt, el este patolog. Toate aceste cunoștințe nu se acumulează nici într'o lună, nici într'un an. Nu există specialitate medicală care să ceară atâta asiduitate, atâtea cunoștințe teoretice și practice.

Numărul redus de astfel de specialiști în țara noastră, unde până de curând în afara centrelor universitare nu se găseau histopatologi, se explică prin totala lipsă de importanță acordată anatomiei patologice de regimul burghezo-moșieresc, care nu putea înțelege rolul acestei discipline în orientarea diagnosticului și terapeuticii.

Pentru motive lesne de înțeles, controlul critic al diagnosticului clinic nu se făcea decât în cazuri foarte rare.

Desvoltarea spiritului critic și autocritic în medicină duce implicit la necesitatea controlului anatomo- și histopatologic al diagnosticului clinic.

In aceste condiții, publicațiile de specialitate devin mai necesare ca oricând, pentru creșterea calificării cadrelor existente și a creării de noi specialiști.

După apariția traducerii celor două volume ale bazelor anatomiei patologice și a tehnicii de autopsie ale academicianului A. I. Abricosov, care au umplut un gol important în literatura noastră medicală, munca în laboratoarele de histopatologie și de histologie a făcut necesară redactarea unui volum de tehnică histologică și histopatologică.

Volumul de față se adresează medicilor care lucrează în laboratoarele de anatomie patologică și histologie ale catedrelor de specialitate, ale institutelor, clinicilor și spitalelor, celor care se specializează în anatomia patologică, precum și laboranților calificați. Ei vor găsi în această « Tehnică histopatologică » cele mai importante tehnici de laborator, verificate în practică de autorii acestei culegeri.

Colectivul de autori nu a avut deloc intenția să culeagă totalitatea tehnicilor de histopatologie create în cursul evoluției acestei discipline. Urmând exemplul « Tehnicii microscopice » a lui G. Roschin, a « Tehnicii scurte de histopatologie » a lui G. A. Merculov, au fost introduse în acest volum numai tehnicile cele mai potrivite pentru diferitele țesuturi și organe ale omului, cele care dau rezultatele cele mai adecvate pentru histodiagnosticul leziunilor, tehnici posibil de realizat în totalitatea laboratoarelor noastre. S'a insistat în special asupra tehnicilor pentru sistemul nervos, ca și a celor de histochimie. Capitole speciale au fost dedicate tehnicii microscopice propriu zise, culturilor de țesuturi, cercetării microorganismelor patogene în țesuturi. Un capitol special a fost consacrat tehnicilor de histopatologie aplicate în expertiza medico-legală, în care anatomia patologică joacă pe zi ce trece un rol tot mai important.

In realizarea acestor diferite capitole, tehnicile cunoscute din diversele lucrări apărute până acum în diferite țări au fost supuse unei priviri critice, în care verificarea lor în practică a constituit elementul de bază.

Colectivul nu are pretenția de fi adus tehnici originale și consideră că lucrarea mai poate fi încă îmbunătățită.

Deaceea autorii așteaptă bucuroși critica constructivă a specialiștilor și cadrelor tinere, pentru ameliorarea viitoare a « Tehnicii histopatologice ».

Iunie 1952. *AUTORII*

PARTEA GENERALĂ

MICROSCOPUL

§ 1. — Instrumentul de cercetare al anatomiei microscopice normale și patologice este microscopul, aparat optic compus care dă o imagine inversată și mult mărită, virtuală sau reală, a obiectelor preparate într'un mod adecvat.

Microscopul este format dintr'un dispozitiv sau sistem optic și dintr'o montură mecanică care alcătuește stativul cu părțile sale constitutive și anexele sale.

§ 2. — **Stativul**, care este suportul sistemului optic, este alcătuit din piciorul, pe care stă microscopul, platina, pe care se așează obiectul de cercetat, tubul, care servește drept suport direct și legătură dintre ocular și obiectiv și din dispozitivele care permit deplasările mecanice, rapide sau fine, ale sistemului optic față de obiectul cercetat și prin aceasta punerea la punct a imaginii microscopice. Aceste dispozitive sunt cremaliera și șurubul micrometric.

Sistemul optic este format din aparatul de luminat, oglindă, diafragm și condensator, din obiectiv și din ocular. Intre obiectiv și ocular se intercalează, în microscoapele moderne, prisme auxiliare care permit folosirea unor tuburi microscopice înclinate sau frânte sau a unor tuburi binoculare care pot fi și ele înclinate sau frânte.

§ 3. — **Piciorul sau partea bazală a microscopului** are forma clasică de potcoavă la modelele cele mai vechi sau mai simple de microscop, și are o formă mult mai variată și complicată la modelele moderne și mari. Piciorul este masiv și greu, pentru a da stabilitatea maximă microscopului și tot de aceea se sprijină în trei puncte. Modelele noi au uneori o bază foarte largă, din metal ușor, în care este fixată și lampa cu becul electric de voltaj scăzut care servește pentru luminatul artificial al preparatului.

§ 4. — **Corpul microscopului** este articulat și înclinabil pe picior, sau face bloc cu dânsul. Când este înclinabil, axul pe care se face mișcarea de înclinație (mișcare care poate să ajungă până la 90°, adică până ce tubul microscopic ajunge orizontal) poate să fie strâns printr'o piuliță

pentru a împreuna mişcarea şi a fixa corpul microscopului în poziţia înclinată dorită. In multe modele, axul acesta cuprinde şi butonul moletat al şurubului micrometric care se află astfel într'o poziţie joasă, apropiată de masa de lucru, odihnitoare pentru mâna care îl manipulează.

§ 5. — In corpul microscopului se află adăpostit dispozitivul de mişcare micrometrică, care astfel este ferit de praf şi de lovituri. Şurubul micrometric se mişcă la exterior din ambele părţi ale stativului prin câte un buton moletat alungit, de diametru mijlociu, legat adesea de o parte cilindrică mai scurtă, dar de un diametru mai mare, un tambur care permite deplasări mai fine. Tamburul este de obicei gradat, fiecare diviziune corespunzând cu o deplasare verticală a tubului cu 1 sau 2 microni. Şurubul micrometric trebue să aibă un mers lin şi uşor, să rămână nemişcat în orice poziţie şi nu trebue forţat niciodată. Pentru orice defect de funcţionare trebue să recurgem neapărat la un mecanic de specialitate.

La unele microscoape moderne, şurubul micrometric deplasează platina şi nu tubul microscopului.

§ 6. — **Cremaliera sau şurubul** pentru mişcarea rapidă permite deplasarea tubului microscopic prin rotirea unei roţi dinţate angrenate cu o cremalieră cu dinţi oblici. Roata dinţată este solidară cu un ax care are de ambele părţi ale stativului câte un buton moletat de diametru mare, prin care i se imprimă mişcarea simplă de rotaţie, cerută de deplasarea rapidă a tubului microscopic.

Mersul cremalierei trebue să fie lin şi uşor, fără să permită însă scoborîrea spontană a tubului. Dacă rotaţia axului se face prea uşor şi tubul se deplasează singur sub acţiunea greutăţii sale, sau dacă i se adaptează de exemplu un aparat de microfotografie sau vreo altă anexă care îl îngreunează, mişcarea sa poate fi făcută mai greu cu ajutorul a două şuruburi de reglare care se găsesc în partea superioară a stativului, în dreptul lagărelor axului, sau la alte modele printr'o mişcare redusă de înşurubare a celor două butoane mari moletate care servesc la mişcarea cremalierei.

§ 7. — **Platina sau masa microscopului** este fixată de stativ şi intercalată între aparatul de luminat şi tubul microscopic. Ea poate fi pătrată sau rotundă. Cele rotunde pot fi fixe, deplasabile prin două şuruburi de centrare sau deplasabile şi rotibile.

Preparatul se fixează pe platină prin « valeţi », lame metalice flexibile care se prind de platină prin tije cilindrice care pătrund cu frecare în nişte găuri aşezate în partea posterioară a platinei. In aceste cazuri, deplasarea preparatului se face cu mâna.

Un dispozitiv extrem de recomandabil este platina sau carul « mobil », care permite deplasarea înceată şi lină a preparatului în două direcţii perpendiculare şi astfel explorarea sistematică a întregului preparat. Carul mobil poartă de obicei câte o riglă gradată cu un « vernier », pentru fiecare din direcţiile sale de deplasare. Cu ajutorul vernierului

se poate însemna şi regăsi orice punct interesant din preparat, definit prin cele două coordonate care corespund centrării acelui punct în mijlocul câmpului vizual, la mărirea potrivită.

Pentru cercetări ştiinţifice, carul mobil cu vernier este un instrument indispensabil, căci scuteşte multă pierdere de timp la regăsirea şi compararea diverselor regiuni ale preparatului microscopic.

§ 8. — **Tubul microscopic** monocular are la partea sa inferioară obiectivul, iar la partea superioară ocularul. Tubul poate să aibă dimensiunile obişnuite sau să fie larg, special, pentru a permite microfotografii cu obiective mici. De cele mai multe ori, tubul microscopic are o parte gradată culisantă, care poate fi adică lungită sau scurtată. Corectarea optică a obiectivelor şi ocularelor este optimă pentru o lungime determinată a tubului microscopic (de obicei 180 mm).

Tubul microscopic poate fi înclinat sau frânt, ceeace permite examinarea într'o poziţie comodă a preparatului care rămâne orizontal. Acest detaliu este important când examinăm preparate proaspete, în mediu lichid, căci împiedică lunecarea lamelei sub acţiunea gravitaţiei. Microscoapele cele mai bune au un tub dublu care permite examenul binocular. In acest caz, cele două tuburi port-ocular se pot deplasa paralel şi pot fi apropiate sau depărtate între ele pentru a corespunde distanţei interpupilare a observatorului. Unul din tuburi mai are un inel moletat care prin deplasarea verticală a ocularului permite modificarea punerii la punct a imaginii corespunzătoare în cazul când cercetătorul are o diferenţă oculară de dioptrii. Examenul binocular este cel mai fiziologic şi nu oboseşte pe cercetător. Efortul pe care trebue să-l facem la un microscop monocular, pentru a menţine închis ochiul liber sau pentru a face abstracţie de imaginea pe care o primim dela acest ochi, este un efort cortical obositor care micşorează atenţia şi reduce calitatea şi durata examenului microscopic.

Unele microscoape au două sau mai multe tuburi diferite care pot fi schimbate între ele.

§ 9. — **Revolverul.** Microscoapele de lucru şi cele de cercetări posedă la capătul inferior al tubului microscopic un dispozitiv care permite schimbarea rapidă şi uşoară a obiectivelor. Acest dispozitiv constă fie dintr'un « revolver » rotativ cu trei sau patru locuri pentru obiective, fie din nişte şine fixe în care se introduc prin lunecare nişte sănii în care sunt înşurubate obiectivele.

Cele mai bune revolvere sunt cele cu patru locuri şi cu dispozitive de centrare a obiectivelor. Dispozitivele cu sanie nu limitează numărul obiectivelor care pot fi schimbate între ele.

Condiţia de bună funcţionare a revolverului este centrarea corectă a obiectivelor. Această centrare face ca un punct anumit dintr'un preparat microscopic care se găseşte în centrul câmpului la o mărire mică să se regăsească tot în centrul câmpului când se schimbă obiectivul mic cu obiective din ce în ce mai puternice. Revolverele obişnuite au o cen-

trare fixă, făcută de fabrică, şi trebue ferite de lovituri care ar putea provoca o descentrare a lor.

§ 10. — **Sistemul optic** se compune din: 1) aparatul de luminat, 2) obiective, 3) oculare şi 4) un număr de prisme care sunt intercalate între obiectiv şi ocular în cazul tuburilor frânte sau binoculare.

§ 10 a. — In revolver este bine să înşurubăm totdeauna obiectivele într'o anumită ordine în locaşul lor. Cel mai des ele se înşurubează în aşa mod încât învârtirea revolverului în sensul unui ceasornic să aducă în axul optic al microscopului obiective din ce în ce mai puternice.

§ 11. — Examenul microscopic poate fi făcut nu numai în lumină transmisă, dar şi în lumină reflectată, prin sisteme de epiobiective folosind o lumină laterală care este reflectată pe suprafaţa obiectului de cercetat printr'o prismă în axul optic al microscopului. Aceasta trimite lumina pe obiect prin obiectiv sau printr'o oglindă circulară care înconjoară fiecare obiectiv în parte.

§ 12. — **Oglinda** mobilă primeşte lumina zilei sau a lămpii de microscopie şi o trimite în condensatorul care se găseşte imediat sub platină.

Oglinda are două feţe, una plană şi alta concavă. Oglinda plană se foloseşte totdeauna când se lucrează cu condensatorul. Oglinda concavă serveşte la luminarea preparatelor examinate la mărire mică, fără condensator, şi dă o imagine a izvorului de lumină în planul preparatului.

Uneori oglinda poate fi deplasată lateral şi prin traiectul oblic al razelor luminoase pune în relief, la mărire mică mai ales, diversele planuri ale imaginii microscopice şi o îmbogăţeşte în detalii structurale.

§ 13. — **Filtrele.** Intre oglindă şi condensator se găseşte de obicei un inel care se poate scoate din axul optic al microscopului şi în care se pot aşeza filtre de sticlă sau de sticlă colorată. Filtrele mate servesc pentru a da o lumină difuză, necesară mai ales la măririle mici, cele colorate (de obicei de sticlă albastră de cobalt) se folosesc la lumină artificială şi absorb o parte din căldura lămpii şi din razele roşii, permiţând o mai justă apreciere a nuanţelor preparatului. Filtre speciale sunt indispensabile pentru lucrările de microfotografie şi ele trebue alese ţinând seama de coloraţia preparatului, de sensibilitatea şi caracteristicile plăcilor sau filmelor folosite. Cele mai des întrebuinţate sunt filtrele galbene-verzui, mai rar filtrele roşii, care se întrebuinţează cu plăcile speciale sensibile la infra-roşu.

Aceste filtre sunt indispensabile în microfotografie, căci sensibilitatea cromatică a materialului fotografic este diferită de aceea a ochiului nostru şi fără ele culorile preparatului sunt redate cu valori diferite de cele obişnuite la examenul direct, ceeace îngreunează interpretarea microfotografiilor.

Tot în aceleaşi inele port-filtru se pot pune şi filtrele de polarizaţie de care vom vorbi mai târziu.

§ 14. — Deasupra port filtrelor se găseşte diafragmul iris, care permite limitarea fascicolului de raze ce vin de pe oglindă şi intră în

364

condensator. Cu ajutorul unui mâner, diafragmul poate fi închis sau deschis, după nevoile examenului microscopic. Un exces de lumină face să dispară multe detalii de structură, mai ales la preparatele examinate fără coloraţie, în stare proaspătă. Deschiderea diafragmului se modifică după obiectivul folosit şi se alege acea deschidere care dă imaginea cea mai netă a câmpului microscopic.

Unele microscoape au diafragmul rotibil şi deplasabil lateral. Acest fel de diafragm permite folosirea unei lumini oblice şi alegerea celei mai potrivite direcţii de iluminare pentru a obţine efecte de relief.

§ 15. — **Condensatorul** este o piesă formată dintr'un sistem de lentile convergente care se găseşte imediat sub platină şi care concentrează lumina pe preparatul de examinat. Condensatorul este indispensabil pentru examenul la mărire mare. El proiectează imaginea izvorului de lumină în planul obiectivului şi o centrează pe câmpul microscopic.

Lentila superioară a condensatorului se deşurubează când acesta se foloseşte cu obiective slabe. Unele condensatoare au această lentilă mobilă şi ea poate fi scoasă foarte uşor din drumul razelor luminoase prin manevrarea unui mâner moletat (condensator tip Bereck).

Deschiderea conului de lumină care iese din condensator trebue să corespundă cu deschiderea celui mai puternic obiectiv folosit. Cele mai luminoase condensatoare curente au o apertură numerică de 1.4 (vezi § 22).

§ 16. — **Obiectivele** sunt sisteme de lupe compuse din mai multe lentile şi dau o primă imagine, virtuală şi mărită, a obiectelor examinate. Ocularele la rândul lor măresc şi inversează imaginea dată de obiective.

Calitatea imaginii virtuale sau proiectate a obiectivului depinde în primul rând de calitatea obiectivului. După calitatea lor, după perfecţia corecţiunilor lor optice, obiectivele se împart în:

— acromate sau obiective curente, care mai prezintă o uşoară aberaţie cromatică şi sferică,

— semiapocromate care sunt mai bine corectate şi

— apocromate, care sunt obiectivele cele mai bine calculate şi care prin folosirea unor asocieri de sticle optice speciale dau o corecţie perfectă pentru aberaţiile de sfericitate şi de culoare.

Planacromatele sunt obiective care dau o imagine perfect plană până la periferia câmpului microscopic.

Lentilele inferioare ale obiectivelor sunt cele mai expuse la deteriorări accidentale. Ele pot fi ciocnite printr'o manipulare neatentă a punerii la punct sau zgâriate când se şterg cu o cârpă sau un tifon murdar.

§ 17. — Distingem obiective uscate şi obiective de imersie. Acestea din urmă se folosesc interpunând un lichid anumit între lentila frontală şi lamela preparatului examinat. Există imersii cu apă, cu glicerină sau cu ulei de cedru. Uleiul de cedru are un indice de refracţie foarte apropiat de acela al sticlei optice şi realizează o legătură omogenă între obiectiv şi preparat.

§ 18. — Obiectivele de imersie necesită o atenție deosebită și o îngrijire specială. Ele sunt obiectivele cele mai scumpe, care dau imaginile cele mai mari și mai bogate în detalii. Cele mai grave greșeli pe care le putem face când folosim aceste obiective sunt: să manipulăm cu brutalitate punerea la punct în așa mod încât să lovim lentila frontală de lama port-obiect și, mai ales, să lăsăm să se usuce (să se oxideze) uleiul de imersie pe obiectiv după folosirea lui. Pentru a îndepărta uleiul întărit pe lentilă trebue să întrebuințăm o cârpă muiată în cloroform care să-l disolve. Folosirea xilenului, benzenului sau toluenului pentru acest scop riscă să deslipească balsamul de Canada care lipește lentilele între ele și să deterioreze în mod iremediabil obiectivul.

§ 19. — Ștergerea după întrebuințare a lentilei frontale a obiectivelor cu imersie de ulei trebue să devină un gest reflex al oricărui microscopist. Trebue să folosim pentru acest scop o cârpă de bumbac sau de in, ruptă dintr'o rufă mult spălată, cârpă care nu se scămoșează, și să recurgem cât mai rareori la un disolvant pentru îndepărtarea uleiului. Dacă ștergem uleiul la timp, putem folosi cârpa uscată sau chiar și pulpa degetului.

§ 20. — Desemnarea diferitelor obiective acromate se face după mărirea lor proprie. Există astfel de exemplu obiective uscate 1, 2, 8, 20, 40, etc. Obiectivele cu imersie au măriri proprii de 70—120 de ori. Înainte se foloseau pentru desemnarea obiectivelor litere sau cifre convenționale care nu dădeau nicio relație precisă obiectivului corespunzător.

§ 21. — Obiectivele apocromate mai pot fi caracterizate și prin distanța lor focală exprimată în milimetri.

§ 22. — Calitatea de planitate și puritate a imaginilor date de un obiectiv este în funcție de perfecția corecțiunilor, iar bogăția de detalii, de apertura lui numerică.

Se numește apertură numerică a unei lentile sau a unui sistem de lentile valoarea numerică a relației matematice:

$$a = n \sin\alpha$$

în care a este apertura numerică, n indicele de refracție al mediului dintre lentila frontală și lamela preparatului și $\sin\alpha$ = sinusul jumătății unghiului de deschidere al sistemului optic considerat.

Unghiul de deschidere este unghiul cel mai mare pe care îl pot forma două raze diametral opuse care plecate dintr'un punct al obiectului pătrund încă în sistemul optic.

Pentru obiective uscate, această apertură numerică poate avea cel mult valoarea 1 (de obicei nu trece de 0,95), pentru obiectivele de imersie cel mult 1,45.

O apertură numerică mare permite o definiție bună a obiectului, adică permite să distingem clar detalii morfologice despărțite prin distanțe extrem de mici. Limita acestei distanțe este de 0,31 μ pentru o

apertură numerică de 0,9 și scade până la 0,19 μ pentru o apertură de 1,40.

§ 23. — Obiectivele moderne au o lungime calculată în așa fel încât prin schimbarea lor (prin învârtirea revolverului sau prin înlocuirea sănii respective) să se găsească aproximativ puse la punct față de obiect, dacă obiectul înlocuit era și el pus la punct.

E nevoie numai de o ușoară corectare a șurubului micrometric pentru a obține o imagine corectă a câmpului.

§ 24. — O precauție foarte bună, care trebue luată pentru a evita lovirea sau spargerea preparatului microscopic prin deplasarea necontrolată a obiectivului, este de a pune preparatul la punct, nu prin apropierea obiectivului de preparat, dar prin îndepărtarea lui.

Pentru aceasta, privind lateral și, controlând mereu distanța dintre obiectiv și lamă, apropiem obiectivul de preparat cât mai mult cu putință. Privim apoi în ocular și ridicăm obiectivul cu ajutorul cremalierei până ce imaginea apare pusă la punct.

§ 25. — **Ocularele** sunt sisteme de lentile prin care privim imaginea microscopică și care se află la extremitatea superioară a tubului microscopic. Ocularele pot proiecta pe un ecran imaginea câmpului. Ocularele sunt desemnate prin mărirea lor proprie. Mărirea totală a imaginii microscopice observate este egală cu mărirea proprie a obiectivului înmulțită cu aceea a ocularului folosit.

Cele mai simple oculare sunt cele zise Huyghens, care se întrebuințează cu obiective acromate. Obiectivele apocromate necesită oculare speciale zise compensatoare, calculate pentru a corespunde calităților optice ale obiectivelor.

Se mai întrebuințează și oculare speciale pentru proiecție și oculare cu câmp vizual mare și perfect plan, denumite oculare ortoplanare.

§ 26. — Ocularele sunt în general formate din două lentile, sau sisteme de lentile, între care se găsește montat un diafragm circular care limitează câmpul microscopic.

La unele oculare se mai poate adapta și « o bonetă » sau apărătoare de ebonită sau de cauciuc care se adaptează la conturul orbitei și împiedică pătrunderea în ochi a luminii laterale, parazite.

§ 27. — Mărirea proprie a ocularului nu poate îmbunătăți calitatea și bogăția de detalii ale imaginii obiectului. Ocularele nu măresc decât imaginile date de obiectiv, fără să-i adauge nimic în plus. Deaceea nu este rațional să întrebuințăm oculare care mărește prea mult. Imaginile obținute pierd în claritate și în luminozitate ceeace câștigă în diametru.

Cele mai folositoare sunt ocularele 8 × sau 10 × care sunt ocularele curente de lucru.

§ 28. — Pentru determinarea dimensiunilor reale ale obiectelor microscopice se folosesc oculare micrometrice care posedă în interiorul lor, fixată la nivelul diafragmului, o placă de sticlă cu o scară gravată

(de obicei nî 100 de diviziuni). Prin deplasarea obiectului şi rotirea la nevoie a ocularului micrometric se face să coincidă dimensiunile obiectului de măsurat cu scara micrometrului ocular. Se citeşte valoarea dimensiunii considerate, exprimată în diviziuni ale scării micrometrice. Transformarea valorilor astfel citite în microni se face înmulţind aceste valori cu un factor numeric care variază după obiectivul folosit şi după lungimea tubului.

Cu ajutorul unei lame port-obiect cu scară micrometrică de 1 mm împărţită în 100 de diviziuni se determină valoarea în microni a fiecărei diviziuni a scării ocularului. Punerea la punct a scării micrometrice se face prin înşurubarea sau deşurubarea monturii lentilei oculare.

§ 29. — Este comod să stabilim odată pentru totdeauna, pentru un ocular micrometric dat şi pentru fiecare obiectiv al microscopului folosit, corespondenţa în microni a diviziunilor ocularului. Se face un tabel în care se trec, pentru fiecare obiectiv, scara micrometrică ocular şi numărul de microni corespunzători, calculaţi pentru fiecare valoare citită pe această scară.

§ 30. — *Ocularele indicatoare* au în interiorul lor un ac care poate fi deplasat din afară. Vârful acului se găseşte în planul diafragmului şi poate fi adus, prin deplasarea lui şi eventual prin rotirea ocularului, să arate orice punct al imaginii microscopice asupra căruia vrem să atragem atenţia unui alt observator. Ca şi la ocularele micrometrice, vârful acului poate fi pus la punct prin mişcarea lentilei oculare. Aceste oculare sunt indispensabile pentru demonstraţii microscopice şi evită multă pierdere de timp în prezentarea preparatelor.

§ 31. — O perfecţionare în plus o prezintă ocularele duble cu indicator. Acestea au un tub în T şi două lentile oculare şi permit ca doi cercetători să privească în acelaş timp imaginea microscopică.

Cu vârful acului se pot indica exact punctele din preparat asupra cărora se discută.

§ 32. — Un tip de ocular mai rar folosit este ocularul comparator cu câmp dublu, care se adaptează în acelaş timp călare la două microscoape de acelaş model. La acest ocular există un tub în T inversat cu două lentile de câmp şi o singură lentilă oculară. Câmpul este împărţit în două jumătăţi şi juxtapune imaginile a două preparate diferite, permiţând compararea simultană.

§ 33. — Pentru anumite cercetări cantitative sau numărători de elemente, forma circulară a câmpului microscopic este nefavorabilă. Se poate întrebuinţa în acest caz un ocular cu diafragm pătrat, fix sau cu dimensiuni reglabile, aşa zise diafragme Ehrlich. In cazul diafragmelor cu dimensiuni fixe se folosesc serii de diafragme a căror suprafaţă variază cu un multiplu a unui factor care de obicei este egal cu 2. Suprafeţele imaginilor delimitate de aceste serii de diafragme sunt în acest caz de 2, 4, 8, 16 şi 32 de ori mai mari decât aceea dată de cea mai mică din ele.

§ 34. — Există pseudooculare care conţin în interiorul lor elemente fotoelectrice de seleniu. Aceste oculare, introduse în locul ocularelor obişnuite, dau naştere la un curent electric de o intensitate proporţională cu lumina primită. Acest curent poate fi măsurat cu un microampermetru potrivit şi dă indicaţii asupra luminozităţii câmpului microscopic. Dispozitivul este folosit pentru determinat în mod obiectiv şi exact timpul de expunere pentru microfotografii.

§ 35. — Dispozitivul de ocular fotoelectric poate fi întrebuinţat pentru determinarea localizării exacte şi a intensităţii benzilor de absorbţie de pe plăcile spectrografice. Pentru aceasta se deplasează spectrograma pe platina microscopului, cu ajutorul carului, şi se notează pentru fiecare poziţie a plăcii intensitatea luminii care trece prin placă şi care este proporţională cu deviaţia acului microampermetrului.

§ 36. — Ocularele pot servi şi la desemnarea imaginilor microscopice. Se folosesc în acest scop aşa numitele « camere clare oculare » sau dispozitive mai simple sau mai complicate. Camera clară ocular este formată dintr'un sistem de prisme care printr'o deschidere laterală a ocularului proiectează în ochiul observatorului imaginea hârtiei şi a vârfului creionului care se află lângă piciorul microscopului, în acelaş timp cu imaginea câmpului. Se poate urmări cu vârful creionului conturul imaginii microscopice, obţinând astfel schiţe care se complectează ulterior.

§ 37. — Există şi aparate mai complicate de tipul camerei clare a lui Abbe, care se pot adapta la orice ocular şi care printr'un joc de sticle fumurii permit slăbirea imaginii celei mai luminoase (a câmpului microscopic sau a hârtiei de desen) până la găsirea celor mai bune condiţii pentru efecturarea desenului.

§ 38. — Procedeul cel mai comod pentru obţinerea unor desene microscopice corecte este acela care foloseşte proiecţia imaginii pe hârtie de desen. Cu vârful creionului se pot urmări contururile şi detaliile interesante şi se realizează maximul de precizie cu minimum de oboseală pentru desenator. Există aparate speciale de proiecţie în vederea desenului, dar se poate improviza un astfel de aparat cu o lampă puternică, un microscop cu tubul înclinat până la orizontală şi o prismă cu reflecţie totală sau o oglindă fixată pe ocular.

§ 39. — Proiecţia imaginilor microscopice este foarte comodă pentru a demonstra preparate în faţa unui auditoriu restrâns. Când audienţa este mare, nu se pot folosi decât măriri relativ slabe, care singure permit obţinerea unor proiecţii suficient de luminoase. Zona din preparat care este proiectată este de obicei extrem de mică şi intensitatea luminii concentrate de condensator în acel punct este atât de mare încât deteriorează foarte uşor preparatul prin supraîncălzire. Condensatorul trebue să fie adaptat obiectivului folosit. Microscoapele speciale de proiecţie sau dispozitivele de microproiecţie au un joc de

trei sau mai multe condensatoare care se pot folosi pe rând pentru diversele obiective curente întrebuințate.

§ 40. — Există oculare speciale de demonstrație care proiectează câmpul microscopic pe o placă de sticlă mată prinsă la capătul unui cilindru sau la baza unui con trunchiat fixat de ocular. Placa de sticlă mată este umbrită de un ecran de tablă sau de carton, vopsit în negru și având în general un diametru de 10—12 cm. Ocularul dă imagini numinoase chiar cu obiective puternice. La microscoapele mari se pot adapta dispozitive pentru microfotografie care permit proiectarea, cu ajutorul unei oglinzi, a imaginii câmpului pe un ecran de sticlă mată dispus într'un plan frontal, tipul cunoscut în fotografie ca « reflex ». Se pot face astfel demonstrații în fața unui grup mai mare de auditori și se poate alege punctul cel mai interesant pentru microfotografie.

§ 41. — Un dispozitiv mai simplu este acela format de o rețea cadrilată gravată pe o placă de sticlă și fixată pe diafragmul ocularului. Rețeaua împarte câmpul microscopic în 100 sau 400 de pătrate de referință și permite transpunerea imaginii pe o hârtie de desen pe care s'au trasat pătrate asemănătoare celor din ocular. Și la acest fel de oculare rețeaua poate fi pusă la punct prin deplasarea lentilei oculare.

§ 42. — **Microscoapele de câmp sau de campanie** sunt construite pentru a ocupa cât mai puțin spațiu și pentru a putea fi strânse într'o cutie compactă în care se găsesc toate accesoriile necesare folosirii lor. Acest tip de microscop permite efectuarea în afara laboratorului a tuturor examenelor curente de microscopie și bacteriologie.

§ 43. — Microscopul este un instrument de înaltă precizie care cere o îngrijire și o atenție particulară în manipularea lui. El trebue ferit de praf și de umezeală. Este dela sine înțeles că trebue evitat să-l stropim cu apă sau cu alte lichide, să-l trântim sau să-l lovim. Când nu-l folosim mai multă vreme e bine să-l păstrăm în cutia lui de lemn. Dacă lucrăm intermitent cu dânsul îl putem acoperi cu o pânză moale, deasă, care nu lasă scame; înainte se foloseau clopote de sticlă cu care se acoperea microscopul pentru a-l feri de praf și de loviri. Aceste clopote erau goale și adesea prea înguste, iar când erau manipulate fără grijă, loveau părțile proeminente ale stativului, pe care le deteriorau. Mult mai raționale sunt clopotele făcute din celon sau din tablă subțire de aluminiu cu ferestre din celon sau de celuloid. Aceste clopote au o greutate redusă, se manipulează foarte ușor și nu riscă să lovească stativul și să-l strice.

§ 44. — O regulă foarte importantă la îngrijirea microscopului este de a nu încerca să-l dregem singuri când se defectează vreo parte a sa. Trebue să recurgem negreșit la ajutorul unui tehnician priceput care singur poate să-l demonteze și să-l remonteze în mod corect. Mai ales trebue evitate deșurubarea și demontarea șurubului micrometric sau a obiectivelor care sunt centrate cu deosebite precauții de fabrica

respectivă. Am subliniat mai înainte importanța curățirii la vreme a obiectivelor de imersie pentru a evita deteriorarea lor în urma uscării uleiului de cedru.

§ 45. — Microscoapele mai vechi, cu tubul de alamă, au acest tub, ca și toate accesoriile de alamă, vopsit cu un lac incolor sau auriu care este solubil în alcool. Trebue evitat să ștergem aceste piese cu orice agent capabil să disolve lacul și să expună piesele respective la oxidare și degradare. Microscoapele moderne au tubul lăcuit cu negru sau cromat și deci inalterabil și nu necesită decât îngrijirile obișnuite ale pieselor astfel protejate.

§ 46. — Piesele mobile ale microscopului trebue mereu șterse de praf și de uleiul de cedru care eventual ar fi venit în contact cu ele. Ele trebue unse destul de rar, cu un ulei mineral neutru foarte subțire, de tipul uleiurilor pentru mașini de cusut. Din timp în timp acest ulei se îmbâcsește cu praf și trebue îndepărtat cu ajutorul unei cârpe umectate in puțină benzină sau xilen.

§ 47. — Cea mai bună unsoare fluidă, dar și cea mai scumpă, este incontestabil uleiul zis de « oase », ulei animal neutru și nealterabil, care nu are tendința să se întindă pe suprafața metalului pe care se găsește. Este uleiul pe care îl folosesc ceasornicarii pentru a unge mecanismele delicate ale roților dințate.

§ 48. — **Izvoarele de lumină** folosite în microscopie sunt lumina zilei sau diferitele lămpi speciale. Lumina zilei, deși cea mai simplu de folosit, este cea mai puțin recomandabilă, deoarece este foarte variabilă ca intensitate, după anotimp, oră și starea cerului.

In orice caz este preferabil de a se folosi lumina unei ferestre orientate spre Nord, prin care nu pătrund de-a-dreptul razele solare.

§ 49. — La nevoie se pot folosi lămpi de petrol, lămpi de gaz cu manșoane incandescente sau lămpi de acetilenă.

§ 50. — Izvorul cel mai bun de lumină pentru microscopie este lumina electrică a unui bec opal sau, în lipsă, a unui bec cu sticlă mată. Lumina electrică, filtrată la nevoie printr'un filtru albastru, este o lumină constantă, care dă totdeauna aceleași valori nuanțelor colorațiilor microscopice.

§ 51. — Pentru *examenul pe fond negru* sau pentru microfotografii instantanee trebue să folosim izvoare mai puternice de lumină. Astfel de izvoare sunt reprezentate de lămpile cu arc sau de lămpile cu voltaj mic. Lămpile cu arc realizează cele mai puternice izvoare de lumină. Ele au inconvenientul de a degaja multă căldură, de a face sgomot, de a avea o lumină variabilă și de a necesita o reglare continuă a distanței cărbunilor, care se consumă relativ repede. Eliminarea căldurii cere neapărat intercalarea unui filtru anticaloric, din sticlă specială, sau cu apă colorată, sau cu o soluție de alaun de potasiu. Pentru rețeaua de curent alternativ se folosesc lămpi cu arc care au ambii cărbuni egali. Se intercalează în serie cu lampa o rezistență care să

scadă voltajul până la valoarea de vreo 70—80 de volți, tensiune care dă arcul cel mai stabil.

§ 52. — *Lampa cu arc* care folosește curentul continuu dă o intensitate luminoasă cu 30% mai mare, pentru același consum, decât lampa de curent alternativ. Pentru curentul continuu, cărbunele legat cu polul pozitiv este de aproximativ două ori mai gros decât cel legat cu polul negativ și la nivelul lui se formează craterul luminos al arcului. Tensiunea cea mai favorabilă este de 60—65 de volți.

§ 53. — Reglarea distanței cărbunilor poate să se facă, pentru ambele feluri de lămpi cu arc, fie cu mâna, prin învârtirea unui șurub, fie cu ajutorul unui mecanism de ceasornic a cărui viteză poate fi reglată în anumite limite, fie prin dispozitive automate puse în mișcare prin mărirea rezistenței electrice (a circuitului) care se produce când distanța dintre cărbuni crește.

§ 54. — Cel mai practic fel de lumină intensă se obține însă prin folosirea unor becuri electrice care ard la un voltaj scăzut (de tipul becurilor de far de automobil). Intr'adevăr, intensitatea fluxului luminos este în funcție de puterea a patra a temperaturii absolute a filamentului incandescent. Filamentul lămpilor electrice se încălzește la o temperatură cu atât mai ridicată cu cât amperajul care trece printr'însul este mai mare. Acest lucru se obține pentru lămpi de 30—50 de vați prin folosirea unui curent de tensiune joasă de 6 sau 12 volți. Aceste lămpi au un filament gros care suportă ușor 5 amperi și care dau un focar luminos foarte intens și cu lumină fixă. Aceste becuri de voltaj scăzut se alimentează cu o baterie de acumulatori sau, când avem la dispoziție o rețea de curent alternativ, cu un transformator (cu sau fără reostat de reglare).

§ 55. — Intre lampa și oglinda microscopului se intercalează totdeauna o lentilă colectoare și eventual filtre colorate sau de sticlă mată.

§ 56. — Examenul obișnuit al preparatelor microscopice se face în lumina normală care trece prin preparat și care suferă modificări în drumul său. In preparatele colorate, anumite raze sunt absorbite selectiv, altele trec nemodificate și dau o imagine colorată a obiectului. Preparatele necolorate dau imagini microscopice prin diferențele de refracție ale diverselor lor părți constitutive, diferențe de refracție care deviază diferit razele ce le străbat și care dau astfel imagini de interferență.

Aceste imagini sunt cu atât mai clare cu cât diafragmul aparatului de luminare este mai mic.

§ 57. — Aspecte particulare se obțin prin luminarea laterală a obiectelor microscopice, mai ales a celor care se găsesc în suspensie într'un mediu lichid. Este examenul pe fond negru, denumit în mod greșit examen ultramicroscopic. Cel mai simplu mod de a obține o luminare laterală a preparatelor, la mărire mică, este acela care folosește un fascicol inelar de lumină obținut cu ajutorul unui ecran discoidal care oprește razele centrale ce intră în condensator. Există diafragme în stea, care se pun în inelul port-filtru al diafragmului și care limitează razele centrale trimise de oglindă spre obiect.

§ 58. — *Condensatoarele* construite special pentru a da un fond negru la măriri mari sunt condensatoarele de tip paraboloid sau cele de tip cardioid. Aceste condensatoare opresc toate razele care ar putea intra direct din aparatul de luminat în obiectiv și luminează puternic lateral preparatul prin razele oblice trimise de o oglindă parabolică inelară sau de un sistem format dintr'o oglindă emisferică convexă, care limitează razele centrale și le trimite pe o oglindă inelară concavă, care la rândul ei le trimite oblic în preparat.

Obiectele care se găsesc în suspensie în drumul razelor oblice ce nu pătrund în obiectiv sunt luminate de aceste raze și le răsfrâng în toate direcțiile, apărând luminoase pe fond negru, ca și firele de praf în suspensie din aer în drumul unei raze de soare care pătrunde într'o cameră întunecată.

§ 59. — Pentru ca efectul de fond negru să fie cât mai clar, trebue ca obiectul examinat, care se află în axul optic al obiectivului întrebuințat, să se afle în același timp în punctul de convergență al tuturor razelor laterale care pătrund în preparat. Cu alte cuvinte, trebue să asigurăm o centrare cât mai perfectă a condensatorului de fond negru. Această centrare se controlează, pentru unele condensatoare, prin centrarea în câmpul microscopic, cu ajutorul unor șuruburi de centrare, a două inele gravate pe fața superioară a condensatorului, sau prin centrarea (în câmpul microscopic) a celui mai luminos punct produs de convergența razelor laterale.

§ 60. — In afară de centrarea perfectă a punctului de convergență a acestor raze pe axul optic al obiectivului mai este importantă înălțimea la care se produce convergența, înălțime care trebue să corespundă cu pătura din preparat care este examinată. Unele condensatoare de fond negru se pot deplasa pe verticală în așa mod încât punctul de convergență să cadă exact în pătura cuvenită a preparatului. Altele impun folosirea unor lame de o grosime determinată. In aceste cazuri, condensatoarele sunt livrate de fabrică cu un șablon metalic care poartă două incizuri de dimensiuni potrivite, cu ajutorul cărora se selecționează lamele utilizabile. Acestea nu trebue să pătrundă în incizura cea mai îngustă, ci prin cea mai largă.

§ 61. — Pentru a împiedica reflexia totală a razelor celor mai oblice care pătrund din condensatorul de fond negru în lama port-obiect, se stabilește o legătură optică între această lamă și fața superioară a condensatorului. Legătura optică cea mai bună se obține printr'o picătură de ulei de cedru. Unele condensatoare sunt calculate pentru a folosi o pătură de apă ca legătură optică între condensator și lamă.

§ 62. — Obiectivele cu imersie au o apertură numerică prea mare pentru a fi folosite la examenul pe fond negru. Ele lasă să intre în microscop o bună parte din razele oblice care luminează preparatul. Totuşi, obiectivele cu imersie pot fi folosite dacă le adaptăm un diafragm interior amovibil, care le micşorează apertura numerică, sau dacă sunt prevăzute de fabrică cu un diafragm iris, care se poate închide până la obţinerea celui mai bun efect optic (se micşorează apertura numerică dela 1,40 la 70).

§ 63. — Examenul pe fond negru permite recunoaşterea particularităţilor de formă şi de mişcare ale unor microorganisme prea fine şi prea delicate pentru a fi examinate altfel în stare vie.

Din acest punct de vedere el reprezintă o modalitate extrem de preţioasă a examenului microscopic, folosit în scop diagnostic sau ştiinţific.

§ 64. — **Examenul ultramicroscopic** propriu zis este un mod de cercetare microscopică a soluţiilor coloidale şi necesită o aparatură cu totul specială şi o tehnică particulară. El nu poate da informaţii directe despre forma şi dimensiunile particolelor coloidale ci, de cele mai multe ori, nu dă decât imagini de difracţie care dovedesc numai existenţa unor particole în suspensie. Examenul ultramicroscopic nu reprezintă o metodă curentă în biologie.

§ 65. — Examenul pe fond negru cere folosirea unor izvoare de lumină extrem de intensă. Lămpile cu arc sau cele de voltaj scăzut şi de mare amperaj sunt singurele care pot da rezultate satisfăcătoare.

§ 66. — In ultimii 15 sau 20 de ani s'a introdus în tehnica microscopică un procedeu nou de examen al preparatelor proaspete necolorate, *examenul cu contrast de faze*. Principiul acestui procedeu este de a transforma variaţiile de indici de refracţie a diverselor structuri ale obiectului în variaţii de intensitate luminoasă. Noţiunea de « fază » se leagă de faptul că lumina îşi micşorează viteza când trece dintr'un mediu de refracţie slab într'altul cu indice de refracţie mai mare. Cum numărul de vibraţii al razelor luminoase, pe unitatea de timp, nu variază cu viteza de transmitere, rezultă că, la ieşirea lor din structura mai refringentă, razele luminoase vor prezenta o decalare de fază faţă de cele care trec prin structurile mai puţin refringente şi invers. Cu ajutorul unor dispozitive optice particulare se pot transforma însă diferenţele de fază în diferenţe de intensitate luminoasă, percepute de retina noastră sau de placa fotografică.

§ 67. — Dispozitivele pentru contrastul de faze sunt formate dintr'o serie de diafragme cu deschidere inelară, de diametru variabil, care corespund fiecare pentru câte unul din obiectivele folosite, şi dintr'o serie de obiective speciale care conţin în interiorul lor, centrat pe axul lor optic, câte o placă de sticlă cu un şanţ circular de o adâncime determinată. Când aparatul este bine pus la punct, imaginea deschiderii circulare a diafragmului trebue să se formeze în şanţul

plăcuţei de contrast din obiectiv. Corectitudinea acestei coincidenţe se controlează cu un ocular special de tip lunetă care permite examinarea plăcuţei de contrast şi a luminării sale. Examenul în contrast de faze se face cu oculare obişnuite cu care se înlocueşte ocularul de control. Obiectivele speciale pot fi folosite şi la examenele curente, în lumină normală.

§ 68. — Contrastul de faze dă imagini foarte bogate în detalii ale obiectelor necolorate sau vii, detalii care sunt complect invizibile în lumină obişnuită, chiar cu diafragmul mult închis sau cu lumină laterală. El permite astfel cercetarea anumitor structuri microscopice native fără intervenţia factorilor perturbători reprezentaţi de fixatori sau coloranţi.

Microscoapele cele mai moderne sunt echipate în mod curent cu astfel de dispozitive şi dau o sumă de informaţii citologice din cele mai interesante, atât pentru diagnostic, cât şi pentru cercetarea ştiinţifică.

§ 69. — Detalii foarte fine ale structurilor native mai pot fi puse în evidenţă printr'un alt procedeu, indirect de data aceasta. Este procedeul de microscopie în lumină ultravioletă. Cum ochiul nostru nu percepe ultravioletul, imaginile se prind pe placa fotografică care este foarte sensibilă la aceste raze. Sticla optică fiind opacă pentru ultraviolet, microscopia în ultraviolet foloseşte o optică de cuarţ, care este transparentă până aproape de ultravioletul extrem. Lamele şi lamelele trebue să fie deasemenea de cuarţ transparent.

§ 70. — Finetea detaliilor date de imaginea microscopică sau, cu un termen fizic, puterea de rezolvare a unui sistem optic dat, este în funcţie de lungimea de undă a luminii folosite. Deaceea, imaginile microscopice ale preparatelor colorate în roşu sunt totdeauna mai şterse decât ale celor colorate în albastru sau violet. Din această cauză, ultravioletul dă cele mai bogate detalii la preparatele necolorate. In plus se adaugă faptul că anumite structuri chimice ale formaţiunilor citologice prezintă o absorbţie puternică în ultraviolet (de exemplu, acizii nucleinici) care apar net în imaginea fotografică corespunzătoare.

Se poate controla astfel realitatea unor structuri, vizibile altfel numai după colorare sau fixare şi colorare.

§ 71. — Izvorul de lumină ultravioletă care se foloseşte pentru microscopia în ultraviolet este de obicei o lampă de cuarţ cu vapori de mercur. Dar se pot folosi şi lămpi speciale, cu hidrogen sub presiune, sau lămpi cu arc ale căror raze vizibile sunt interceptate de filtre speciale (de tip Wood). Lămpile cu arc folosesc cărbuni metalizaţi, au o temperatură foarte ridicată a craterului lor pozitiv şi dau cel mai mare flux de raze ultraviolete.

§ 72. — **Microscopul de fluorescenţă** foloseşte deasemenea lumina ultravioletă pentru a excita fluorescenţa unor anumite structuri microscopice, spontan fluorescente, sau făcute fluorescente prin colorare cu coloranţi speciali (fluorocromi) ca auramina sau tripaflavina de

exemplu; microscopul de fluorescență nu are nevoie de optică de cuarț decât până la nivelul lamelei. Obiectivele și ocularele pot fi de tip obișnuit, căci lumina fluorescentă se găsește în spectrul vizibil pentru care optica obișnuită este perfect transparentă. Totuși, o parte de ultraviolet poate ajunge până la ochiul observatorului, chiar în aceste condiții. El trebue eliminat prin filtre speciale puse peste ocular pentru a împiedica apariția unei oftalmii foarte grave (care poate rezulta din examenul făcut fără precauțiile cuvenite). Microscopul de fluorescență se folosește între altele la căutarea bacililor Koch, după colorarea preparatelor cu auramină.

§ 73. — Un procedeu de examen microscopic apropiat de examenul de fluorescență este examenul pe fond negru al frotiurilor colorate cu Giemsa. In aceste condiții, anumiți paraziți (spirochete, treponeme) apar luminoși și colorați în altă nuanță decât fondul preparatului.

§ 74. — Microscopul biologic poate fi transformat ușor în *microscop cu lumină polarizată*. Există însă microscoape speciale pentru mineralogie care sunt echipate cu toate dispozitivele necesare unui examen complect în lumină polarizată și care posedă o platină rotativă cu gradații (în grade unghiulare) și cu vernier. Această platină rotativă, asociată cu folosirea unui ocular cu reticul, permite măsurarea corectă a unghiurilor în preparatul microscopic.

§ 75. — Lumina polarizată permite obținerea unor informații extrem de prețioase asupra ultrastructurilor microscopice, adică a structurilor biologice la nivelul micelelor și al moleculelor. Microscopul polarizat permite recunoașterea unei anizotropii structurale care se manifestă prin anizotropia optică corespunzătoare. El permite precizarea poziției elipsoidului indicilor de refracție față de structurile morfologice corespunzătoare și prin aceasta dă indicații structurale deosebit de interesante.

§ 76. — Lumina obișnuită normală este un fenomen ondulator transversal, extrem de frecvent, care se produce în toate azimuturile perpendiculare pe direcția de propagare a razelor sale. Nicio direcție nu este privilegiată și există deci o omogenitate, o izotropie complectă a unui astfel de fascicol de raze luminoase.

Lumina polarizată liniar prezintă o direcție unică de vibrație a undelor sale, o direcție privilegiată, o anizotropie, care poate fi pusă în evidență prin dispozitive speciale.

Această lumină este modificată în mod caracteristic de obiectele anizotrope prin care trece și permite astfel analiza lor optică. Intre aceste două extreme există și toată gama de stări intermediare, de polarizări parțiale, precum și polarizări circulare care pot fi dextro sau levogire.

§ 77. — Pentru microscopia biologică în lumină polarizată se întrebuințează un dispozitiv de polarizare și altul de analiză a aspectelor particulare provocate de luminarea cu lumină polarizată, un dispozitiv analizator. Polarizatorul și analizatorul pot fi de tipul nicolilor, adică

al prismelor de spat de Islanda, sau al filtrelor de polarizare denumite polaroide. Polarizatoarele prin reflexie pe sticlă neagră sau prin refracție multiplă sub un unghi particular prin pachete de plăci subțiri de sticlă sunt rezervate lupelor de polarizare sau examenului cu ochiul liber.

§ 78. — Prismele de tip Nicol, cu variantele lor, dau o lumină incoloră perfect polarizată liniar, dar slabă ca intensitate. In plus, ele îngustează câmpul de observație microscopică, sunt delicate și scumpe. Cele mai practice polarizatoare și analizatoare sunt filtrele polaroide. Acestea sunt formate din plăci cristaline foarte subțiri de biiodură de chinină (herapatit) sau alte substanțe asemănătoare, puternic birefringente și care absorb aproape complect una din cele două raze în care se descompune lumina ce intră în ele. Polaroidele au o culoare proprie, gălbuie sau cenușie, și nu polarizează toate lungimile de undă. Chiar când sunt perfect încrucișate, ele lasă să treacă o lumină roșie-violaceeînchis care însă nu împiedică folosirea lor, cu rezultate foarte bune, atât la examenul direct, cât și pentru microfotografie.

§ 79. — Prismele sau filtrele de polarizare se intercalează, pentru polarizator între izvorul de lumină și condensator, iar pentru analizator, între ocular și ochiul observatorului sau între ocular și obiectiv. Polarizatorul se orientează de obicei în așa mod încât planul de polarizare (care este planul perpendicular pe planul de vibrație al razelor de lumină polarizată) să fie așezat frontal, adică dela dreapta la stânga, iar analizatorul se orientează cu planul de polarizare în direcția sagitală, adică dinainte înapoi.

§ 80. — Folosind o lampă puternică de microscopie și, dacă încrucișarea polarizatorului și analizatorului sunt bine făcute, câmpul microscopului rămâne aproape complect obscur. Orice obiect birefringent examinat la microscop în aceste condiții apare luminos pe câmp întunecat. Când rotim preparatul, în așa mod încât obiectul birefringent să descrie o învârtitură complectă în jurul axului optic al microscopului, el devine de patru ori obscur și de patru ori prezintă o luminozitate maximală. Se stinge și se aprinde deci de patru ori în timpul unei rotații de 360 grade. Pozițiile succesive de stingere se află la 90° unele de altele, ca și cele de luminozitate maximală. Pozițiile de stingere și cele de luminozitate maximală fac între ele un unghi de 45°.

§ 81. — In poziția de stingere sau de extincție, cum se mai zice, direcția celui mai mare sau a celui mai mic indice de refracție, sau direcțiile *ng* și *np*, cum se notează convențional acești indici, se află paralele cu direcția planului de polarizare sau a celui de vibrație al polarizatorului sau al analizatorului. Dacă avem de a face cu un obiect birefringent anizodiametru, alungit, putem determina dacă acești doi indici optici se află paraleli sau perpendiculari cu direcția lui de alungire sau dacă fac un unghi oarecare cu ea. In primul caz avem de a face cu o extincție dreaptă, iar în al doilea cu o extincție oblică și putem măsura unghiul de oblicitate caracteristic pentru un obiect dat.

§ 82. — Când birefringența obiectului examinat în lumină polarizată este foarte pronunțată sau când grosimea lui este destul de mare, fenomenul optic de luminozitate maximală între polarizatorii încrucișați descris mai sus, se complică prin apariția unor culori vii de interferență, care variază cu intensitatea birefringenței și cu grosimea obiectului, și care se succed într'o ordine anumită alcătuind scara cromatică a lui Newton. Sunt culorile bulelor de săpun sau ale picăturii de petrol pe suprafața asfaltului ud.

§ 83. — *Scara cromatică de interferență* a lui Newton prezintă, în succesiune, culori și nuanțe din care unele se repetă cu variații de tentă, despărțind toată scara în grupe de culori denumite ordine. Iată aceste culori din primele V ordine:

Ordinul I	Ordinul II	Ordinul III
negru	purpuriu	violet-albăstrui-deschis
cenușiu ca fierul	violet	indigo
cenușiu ca levănțica	indigo	albastru-verzui
cenușiu-albăstrui	albastru-pur	verde
cenușiu	albastru-verzui	verde-strălucitor
alb-verzui	verde	galben-verzui
alb aproape pur	verde-deschis	roșu-gălbui
alb-gălbui	verde-gălbui	roșu-carmin
galben-pai-palid	galben-verzui	purpur-mat
galben-pai	galben-pur	cenușiu-violet
galben-luminos	portocaliu	
galben-intens	portocaliu-roșietic	
galben-brun	roșu-violaceu-închis	
portocaliu-roșietic		
roșu-cald		
roșu-intens		

Ordinul IV	Ordinul V
cenușiu-albăstrui	verde-albăstrui-mat
verde-marin-mat	roșu-gălbui-mat
verde-albăstrui	
verde-luminos	
verde-cenușiu-clar	
cenușiu aproape alb	
roșu-gălbui	

Nuanțele cele mai bogate și mai vii se găsesc la limita dintre ordinul I și ordinul II, la nivelul roșului zis de ordinul I (sau RI.)

Cu cât ordinile cresc, cu atât culorile sunt mai puțin pure, sunt mai spălăcite, mai bogate în lumină albă, mai diluate. Dacă examinăm între filtre sau nicoli încrucișați o pană tăiată dintr'un corp puternic birefringent, întâlnim dela tăiș spre muchea penei culorile de interferență în ordinea prezentată mai sus. O astfel de pană poate servi la determinarea intensității birefringenței unui obiect microscopic oarecare, după cum vom vedea mai departe (vezi § 91).

§ 84. — O placă cristalină poate fi clivată dintr'un cristal de gips și subțiată până dă între nicoli încrucișați roșul de ordinul I. O astfel de placă de gips, montată într'un suport apropriat, poate să servească la determinarea direcției în care se află indicele *ng* și indicele *np* față de axa de alungire a unui obiect microscopic birefringent în formă de bastonaș sau de prismă. Pentru aceasta trebue să cunoaștem orientarea acestor axe în placa de gips RI. In plăcile furnizate de casele de optică, direcția indicelui *ng* este marcată printr'o linie gravată pe montura plăcii. Ele se intercalează în microscop în așa fel, încât, în câmpul microscopic, indicele lor *ng* să se afle pe linia care unește ora $1^1/_2$ cu $7^1/_2$ sau în diagonala I, cum se numește convențional această diagonală.

Principiul determinării direcției indicelui *ng* într'un obiect dat cu o birefringență relativ slabă, cum sunt majoritatea obiectelor biologice este extrem de simplu. Așezăm obiectul în poziția de luminozitate maximală, adică cu axul lui cel mai lung într'o diagonală a câmpului microscopic (polarizatorul și analizatorul fiind orientate frontal și sagital cum am arătat la § 79) și intercalăm placa de gips între obiect și analizator sau între obiect și polarizator, așa încât indicele lui mare de refracție *ng* să fie paralel cu direcția de alungire a obiectului. Câmpul microscopic apare colorat și putem distinge două cazuri, și anume: culoarea obiectului să fie albastră, să corespundă adică cu o nuanță superioară din ordinul II, sau să fie galbenă, adică o culoare inferioară, din ordinul I. In primul caz se spune că obiectul și placa de gips se găsesc în adiție și culoarea de interferență crește, ceeace corespunde cu paralelismul indicelui mare al lamei de gips și al indicelui mare al obiectului, deci cu o creștere a birefringenței sistemului suprapus format din obiect și placa de gips. In al doilea caz, obiectul și placa de gips se găsesc în substracție, culoarea de interferență scade, direcțiile celor doi indici *ng* sunt perpendiculare una pe cealaltă și sistemul prezintă o diminuare a birefringenței. In primul caz se spune că obiectul este pozitiv birefringent în direcția alungirii sale și se deduce că materia din care este format este mai densă în această direcție. In al doilea, obiectul este negativ birefringent și materia este mai densă în direcția perpendiculară pe alungirea ei.

§ 85. — Când avem de a face cu picături sferice birefringente, acestea apar ca o cruce neagră, de tip cruce de Malta, centrată pe centrul lor și au cadrantele luminoase, cu maximul de lumină la 45° față de brațele crucii. Dacă le examinăm după intercalarea lamei de gips RI în poziția ei normală (cu *ng* în diagonala I) se pot întâlni două cazuri, cadrantele dela 12 la 3 și dela 6 la 9 să apară albastre, adică în adiție, pe când cele dela 3 la 6 și dela 9 la 12 să apară galbene, sau viceversa. In primul caz avem de a face cu picături zise pozitiv birefringente, în al doilea cu picături negativ birefringente. Structurile moleculare cele mai dense sunt radiare la cele pozitive și tangențiale la cele negative.

§ 86. — Când obiectele microscopice sunt extrem de subțiri, extrem de mici, sau prezintă o birefringență foarte slabă, trebue să folosim

artificii speciale pentru a pune în evidență această birefringență. O metodă simplă este aceea de a așeza placa de gips cu direcția *ng* la 3° sau 4° spre dreapta față de direcția sagitală a câmpului microscopic. Câmpul rămâne încă aproape complect întunecat și obiectele slab birefringente apar net luminoase în diagonalele câmpului, cu nuanțele lor de adiție sau de substracție.

§ 87. — Există lame de gips care dau nuanțe de roșu de ordinul II, III sau IV, care se folosesc pentru cercetarea obiectelor puternic birefringente. Pentru biologie sunt însă importante birefringențele slabe. Acestea pot fi puse în evidență prin folosirea unei lamele de mică, zisă lamelă sfert de undă, care se intercalează între nicoli și care dă o culoare cenușie și variații de nuanță de interferență când vine în substracție sau în adiție cu obiecte slab birefringente.

§ 88. — Un alt artificiu constă în a folosi coloranți cu moleculă sau micel alungit care să coloreze electiv obiectul de cercetat, a cărui birefringență este prea slabă pentru a apărea la examenul direct. Moleculele sau micelele de colorant orientate paralel prezintă o birefringență netă, în care coloratia proprie interferează cu fenomene de dicroism. Când aceste molecule, sau micele, sunt adsorbite orientat pe substratul cu structură orientată pe care îl colorează, ele îi transmit birefringența lor și trădează anizotropia structurii lui.

§ 89. — Putem recunoaște coloranți care au molecule sau micele orientabile, uscând pe o lamă o picătură de soluție apoasă sau slabă alcoolică de colorant și trecând apoi cu o așchie de lemn peste picătura uscată. Se produc astfel urme alungite de orientare mecanică, care apar birefringente și dicroice în lumina polarizată.

§ 90. — Intensitatea birefringenței unui obiect se poate măsura și se poate exprima în unități arbitrare sau în diferențe de lungime de undă (între undele care interferează la ieșirea din obiect). Principiul metodei de măsurare este de a anula birefringența necunoscută printr'un dispozitiv care permite suprapunerea peste obiect a unei plăci cristaline de o birefringență cunoscută, dar orientată în substracție față de prima. Aceste aparate de măsură se numesc compensatoare.

§ 91. — Compensatorul cu muchie de cuarț este format dintr'o pană de cuarț, a cărei grosime variază în mod foarte regulat dela muchia ascuțită până la cea groasă. Pana este gradată în unități de lungime. Examinată între nicoli încrucișați, ea prezintă în lungul ei toată gama culorilor de interferență, dela prima nuanță din ordinul I și până la un roz spălăcit de ordinul V sau VI.

Așezăm obiectul în câmpul microscopic, în poziție de luminozitate maximă, între nicoli încrucișați; introducem în deschiderea special prevăzută pentru aceasta pana de cuarț și o deplasăm până când una din zonele colorate de interferență, suprapusă peste obiect, îi scade culoarea până la negru. Citim gradația respectivă pe compensator și pe un tabel găsim valoarea corespunzătoare a birefringenței astfel determinate.

Bineînțeles, obiectul trebue orientat în acea diagonală în care se găsește în substracție față de pana de cuarț.

§ 92. — Un alt tip de compensator, zis al lui Bereck, este format dintr'o placă de cuarț de o grosime uniformă, care se intercalează între nicoli, orizontal și în diagonala cuvenită. Această placă poate fi basculată în jurul unui ax orizontal în așa mod încât grosimea ei aparentă, în direcția trecerii razelor luminoase, să crească în funcție de sinusul unghiului pe care îl face cu orizontala. Un vernier permite citirea unghiului de basculare și un tabel dă valoarea birefringenței corespunzătoare.

§ 93. — Putem examina la microscop și suprafața unor obiecte opace. In aceste cazuri nu putem folosi lumina transmisă, ci numai aceea reflectată. In microscopul pentru cercetarea capilarelor pielei, capilaroscop, luminarea se face cu ajutorul unui mic bec electric care proiectează lateral, printr'o lentilă, un fascicol de lumină intensă pe zona de piele observată. Această zonă este acoperită de o picătură de ulei de cedru pentru a-i mări transparența și de o lamelă de sticlă pentru a evita reflexele supărătoare la suprafața uleiului. Mărirea folosită nu poate fi însă prea mare.

§ 94. — Există și obiective speciale denumite *ultropac* care permit măririle cele mai mari, până la imersie inclusiv. Aceste obiective sunt înconjurate de dispozitive optice inelare prin care lumina ce vine dintr'o parte, printr'o piesă intermediară, este proiectată lateral și circular pe suprafața examinată.

§ 95. — Alte dispozitive, folosite la microscoapele metalografice, proiectează lumina axial, prin lentilele obiectivelor, cu ajutorul unei prisme cubice cu reflexie totală intercalată într'o montură intermediară între tubul microscopic și obiectiv.

§ 96. — Obiectivele ultropace permit examenul anatomopatologic rapid al unor suprafețe de secțiune, proaspăt făcute în organe sau piese de biopsie, colorate superficial cu metode adecvate.

§ 97. — Preparate de insecte, opace din cauza chitinei, ca și alte obiecte microscopice netransparente, pot prezenta detalii bogate de structură prin microfotografie în lumină infraroșie. Razele infraroșii au o mare putere de pătrundere și, folosite cu plăci speciale, sensibile pentru razele lungi ale spectrului, dau imagini fotografice bogate și perfect utilizabile acolo unde microfotografia simplă dă numai umbre întunecate.

§ 98. — Un tip de examen microscopic particular este *microspectroscopia*, care se face cu un ocular special și prin care se poate determina spectrul de absorbție al unui obiect microscopic colorat. Cu ajutorul ocularului micro-spectroscopic se pot recunoaște de exemplu benzile de absorbție ale oxihemoglobinei sau methemoglobinei într'un singur globul roșu. Ocularul spectroscopic se compune dintr'un ocular cu diafragme mobile (care permit limitarea câmpului la obiectul

de cercetat) şi dintr'un tub cu prisme care se poate adapta peste ocular şi care descompune lumina venită dela obiect.

O prismă auxiliară permite compararea spectrului obiectului cu spectrul unei soluţii de referinţă. Aceasta se pune într'o eprubetă şi se fixează printr'un arc pe un suport lateral care face corp comun cu tubul spectroscopic. Tubul spectroscopic are fanta reglabilă, pentru a permite observarea benzilor slabe, şi două oglinzi mobile care să lumineze, una tubul cu soluţia de referinţă şi cealaltă o scară gradată în lungimi de undă. Un şurub de reglare permite deplasarea scării gradate şi ajustarea ei corectă faţă de un spectru de emisiune de referinţă cu benzi luminoase înguste.

§ 99. — Pentru marcarea punctelor interesante dintr'un preparat folosim un port-diamant rotativ care se înşurubează în locul unui obiectiv şi care prin învârtire gravează pe lamelă un cerc centrat pe mijlocul câmpului microscopic. Vârful diamantului se poate deplasa lateral, gravând cercuri de diametre variabile.

§ 100. — Un procedeu extrem de practic este acela care foloseşte lama specială de reperaj a lui Kazeef pe o platină cu car. Această lamă este o placă fotografică de dimensiunile unei lame normale (76 ×26 mm) pe care sunt imprimate 3750 de dreptunghiuri de câte 900 ×50 microni, numerotate dela 1001 la 4705. Pe verticală numerele cresc cu câte o unitate, pe când pe orizontală ele cresc cu câte 50 de unităţi dela un rând la altul. Pentru a marca un punct interesant îl centrăm în câmpul microscopului la mărimea potrivită, apoi, fără a deplasa carul, înlocuim preparatul cu lama lui Kazeef. Citim numărul căsuţei care se găseşte în centrul preparatului şi acest număr reprezintă reperul căutat. Pentru operaţia inversă de regăsire a unui punct interesant dintr'un preparat dat punem pe platina cu car a microscopului lama lui Kazeef, deplasăm carul până ce numărul reper al punctului corespunzător apare în centrul câmpului şi, fără a mişca carul din loc, înlocuim lama cu preparatul cercetat. Avantajul lamei lui Kazeef este de a permite reperarea unui punct interesant pe orice alt microscop decât acela care a servit la desemnarea lui sau de către orice cercetători care posedă o astfel de lamă.

§ 101. — Unele examene microscopice speciale trebue făcute la o temperatură anumită, constantă sau nu. Pentru acest scop se folosesc platine încălzitoare sau răcitoare, cu circulaţie de apă caldă sau de soluţii reci, sau dispozitive cu rezistenţe electrice care pot fi încălzite prin trecerea unui curent potrivit. Temperatura în acest din urmă caz poate fi reglată prin modificarea curentului de încălzire şi eventual poate fi menţinută constantă cu ajutorul unui termoregulator. Un termometru de o formă potrivită poate indica temperatura adevărată a preparatului examinat.

§ 102. — Pentru culturi de ţesuturi se pot folosi mici dulapuri termostate în care se păstrează microscopul cu lama de cultură şi din

care ies numai ocularul şi şuruburile de punere la punct. O fereastră cu geam permite luminarea preparatului, dacă nu folosim un microscop cu lampă electrică fixă.

§ 103. — Informaţii interesante asupra structurilor se pot obţine la examenul microscopic prin folosirea *micromanipulatoarelor*. Acestea sunt aparate anexe care permit deplasarea fină şi perfect condusă în câmpul microscopic a unor instrumente speciale, în speţă vârfuri microscopice ale unor pipete, cuţite sau baghete de sticlă. Cu ajutorul lor putem comprima, înţepa, tăia sau deforma diverse obiecte microscopice, le putem injecta cantităţi extrem de reduse de reactivi sau putem să scoatem din ele anumite părţi constitutive solide sau lichide, putem izola şi recolta anumiţi germeni, spori sau celule pentru înmulţire, etc.

§ 104. — Primul micromanipulator perfecţionat construit este acela al lui Peterfi, şi se compune dintr'o placă peste care se pune microscopul. La dreapta şi la stânga microscopului se găsesc fixate de placă două coloane verticale de care sunt prinse instrumentele de micromanipulaţie prin cleme, fixate pe suporţi mobili în cele trei direcţii ale spaţiului. Mişcările pentru fiecare direcţie se fac prin câte două şuruburi, unul pentru mişcarea rapidă, altul pentru mişcarea lentă. Materialul supus microdisecţiei sau micromanipulaţiei se găseşte suspendat într'o picătură de lichid pe faţa inferioară a unei lamele mari montate pe o cameră de microdisecţie deschisă lateral. Prin aceste deschizături pătrund instrumentele de micromanipulaţie, ale căror vârfuri sunt aduse în câmpul microscopic la o mărire mică şi care se deplasează prin şuruburile respective potrivit cu operaţiile pe care dorim să le efectuăm.

§ 105. — Inconvenientul major al acestui micromanipulator constă în inversarea imaginilor microscopice şi în complicaţia manoperelor necesare pentru a obţine rezultatele dorite. Mişcând şuruburile din dreapta se deplasează instrumentele din stânga şi vice-versa. Crearea reflexelor necesare pentru manevrarea lor corectă cere mult timp şi mult exerciţiu.

§ 106. — Instrumentele de sticlă pentru micromanipulator se lucrează în flacăra de gaz, cu atât mai mică cu cât dimensiunile lor sunt mai reduse. Ultimele vârfuri se trag dintr'o flacără de cel mult 1 mm înălţime care se obţine la vârful unui ac subţire de injecţii tăiat transversal şi folosit ca bec Bunsen.

§ 107. — Manipulatorul lui Fonbrunne este mult mai perfecţionat, dar şi mult mai scump. El se compune dintr'unul sau două transmiţătoare de mişcare, cu câte o singură pârghie fiecare, cuplate cu câte un port-instrument mobil care urmează fidel şi mult demultiplicat mişcările pârghiei de comandă. Transmiţătorul este format din trei pompe, aşezate în cele trei direcţii ortogonale ale spaţiului. Ele au pistoanele lor articulate de pârghia unică care se mişcă concomitent cu dânsa. Pompele sunt legate cu tuburi de cauciuc cu trei tone de

tip « barometru aneroid » ortogonal articulate la rândul lor cu port-instrumentul şi care îi transmit cele mai fine mişcări ale pârghiei de comandă. Legăturile prin tuburile de cauciuc fiind mobile, un manipulator poate fi pus la dreapta microscopului şi port-instrumentul respectiv poate fi aşezat la stânga. In câmpul microscopic, vârful instrumentului apare în aceeaşi parte cu transmiţătorul de mişcări şi se deplasează aparent homotetic cu dânsul, ceeace uşurează foarte mult manipularea lui corectă.

§ 108. — Instrumentele pentru micromanipulatorul lui Fonbrunne se fasonează la o « microforjă », la căldura unui fir de platină încălzit prin trecerea unui curent electric reglabil, şi sub controlul optic făcut cu ajutorul unei lupe binoculare puternice puse la punct pe focarul de încălzire.

§ 109. — Am arătat că mărirea maximală perfect clară care se poate obţine la microscopul obişnuit este de ordinul a 2000 în diametru. In general se folosesc măriri de ordinul 800—1000 în diametru. In lumină obişnuită, puterea de rezolvare a microscopului nu poate trece de această limită impusă de natura vibratorie a luminii şi de lungimea de undă respectivă. Sensibilitatea maximală a ochiului fiind în galbenul-verzui, se situează cam la lungimea de undă de 0,55 μ, ceeace reduce limita de definiţie la aproximativ 1/4 μ.

§ 110. — Pentru a obţine imagini la măriri şi mai mari trebue să recurgem la altfel de raze decât cele luminoase. Razele formate de un bombardament de electroni s'au dovedit a fi capabile de a da imagini a căror limită n'a fost încă atinsă, dar care au ajuns în ultimul timp la valori de 500 000—2 000 000 în diametru. Microscoapele care folosesc astfel de raze formate din electroni sunt microscoapele electronice.

§ 111. Microscopul electronic se compune dintr'un emiţător de electroni (un filament de tungsten încălzit la incandescenţă prin trecerea unui curent electric), un dispozitiv de înaltă tensiune care accelerează şi trimite aceşti electroni sub formă de raze electronice şi de un sistem de lentile care le abat din calea lor şi care produc imaginea electronică.

§ 112. — Există un paralelism perfect între construcţia unui microscop optic şi a unui microscop electronic: izvor de lumină, condensator, port-obiect, obiectiv care dă o primă imagine şi ocular care măreşte imaginea dată de obiectiv sunt părţi constitutive ale ambelor tipuri de măritor. Deosebirea constă în faptul că ochiul nostru nu este sensibil la raze electronice.

§ 113. — Microscopul electronic deviază razele de electroni şi formarea imaginii se produce prin câmpuri electrostatice puternice dispuse circular în drumul electronilor şi având încărcături pozitive sau negative, câmpuri care alcătuesc un fel de adevărate lentile electrostatice fără aberaţie de sfericitate sau dispersie cromatică.

§ 114. — In alte tipuri de microscoape electronice lentilele sunt de tip electromagnetic şi sunt formate din bobine fără miez, străbătute de curent. Aceste lentile electromagnetice au aceleaşi calităţi electronoptice ca şi cele electrostatice.

§ 115. — Electronii se deplasează fără obstacol în vid. Deaceea, tubul microscopului electronic, în care se află toate organele principale, inclusiv obiectul de examinat, este pus în legătură cu o pompă de vid care reduce presiunea interioară a aerului la câteva sutimi de milimetru de mercur, valoare compatibilă cu buna funcţionare a sistemului de raze electronice.

§ 116. — Ochiul uman fiind insensibil la imaginile electronice, acestea sunt proiectate pe ecrane luminiscente care devin luminoase în părţile lovite de electroni şi rămân obscure în zonele care corespund razelor electronice interceptate sau absorbite de obiect. Ecranul se află şi el în vid şi imaginea care se formează la nivelul său se examinează printr'o fereastră laterală.

§ 117. — Obiectul trebue să fie extrem de subţire, sub un micron, din cauza puterii reduse de pătrundere a electronilor. Lama port-obiect trebue să fie foarte subţire, pentru a nu opri şi dânsa un procent însemnat din razele electronice. Deasemenea, fiind examinate în vid, obiectele trebue să fie uscate. Este o întreagă problemă tehnică de a obţine obiecte suficient de subţiri pentru examenul electronooptic. Lama pe care se examinează aceste obiecte este de obicei o peliculă extrem de subţire, obţinută prin evaporarea unei picături de soluţie diluată de colodiu sau de alt material plastic.

§ 118. — Imaginea electronooptică nu are o asemănare perfectă cu imaginea microscopică obişnuită. Ea reprezintă numai umbra obiectului în fascicolul de raze electronice, cu zonele lui de opacitate maximală şi de transparenţă relativă, dar îi lipsesc detaliile de structură suprapuse care se observă la microscopul obişnuit prin mişcarea şurubului micrometric. In schimb, măririle curente ale imaginilor sunt de ordinul a câtorva zeci de mii în diametru şi ele pot fi mărite şi mai mult la reproducerea fotografică a clişeului.

§ 119. — Detalii şi mai fine de suprafaţă şi de relief se obţin printr'un artificiu tehnic, şi anume, prin metalizarea preparatului. Prin metalizare înţelegem pulverizarea pe suprafaţa obiectului a unor vapori metalici (de obicei de aur) obţinuţi prin volatilizarea unui fir metalic aşezat deasupra preparatului şi încălzit la temperatura potrivită prin curenţi de înaltă frecvenţă. Cu ajutorul unor dispozitive speciale se poate da orice înclinaţie dorită faţă de verticală fascicolului de vapori metalici care se condensează pe preparat. Se produc efecte de umbre purtate care dau un relief deosebit imaginilor electronice obţinute prin acest procedeu.

§ 120. — Inregistrarea imaginilor electronice se face pe plăci sau filme fotografice cu granulaţie fină care permit mărirea ulterioară a foto-

grafiilor obținute. Prin această mărire secundară, care nu adaugă niciun element nou de structură sau de detaliu, se poate atinge maximul de mărire dat de această aparatură.

§ 121. — Măririle obținute în mod curent sunt de ordinul a 10 000—60 000 în diametru și ele sunt suficiente pentru nevoile biologiei. In mod excepțional s'a ajuns însă și la măriri de 2 000 000 în diametru. La această considerabilă amplificare a imaginii se pot distinge, de exemplu, chiar atomii din rețeaua cristalină a unor clivaje subțiri de diverse minerale.

PREPARATUL PROASPĂT

§ 122. — Examenul preparatului în stare proaspătă privește de cele mai multe ori următoarele țesuturi sau organe: membrane subțiri ca mezenterul sau epiploonul, fire de păr, vase sanguine de calibru mic, nervi, celule desprinse de pe mucoase, spermatozoizi, ouă de paraziți, celule sau paraziți sanguini.

Examenul în stare proaspătă se face între lamă și lamelă, ca și preparatul fixat, căutând ca fragmentul de țesut sau celulele să se găsească într'o stare cât mai apropiată de cea pe care o au în organism. Ceeace trebue evitat cu cea mai mare grijă este ca țesuturile cercetate să se usuce. Pentru a îndeplini această condiție se întrebuințează ca medii de montare și studiu, lichide naturale sau artificiale.

§ 123. — **Lichidele naturale** sunt: lichidul amniotic, umoarea apoasă a ochiului, limfa, serul sanguin, plasma. Toate aceste lichide trebue să fie recoltate steril.

§ 124. — **Lichidele artificiale.** In această categorie intră în primul rând *soluțiile saline fiziologice* care diferă după animalul al cărui țesut îl studiem: pentru mamifere concentrația de NaCl este de 0,9 g %, pentru păsări 0,75 g %, pentru salamandră 0,80 g %, pentru broască, 0,64 g %; pentru animalele marine concentrația în NaCl se mărește cu circa 1,5—2,6% față de speciile terestre sau de apă dulce, sau se amestecă soluția salină cu apă de mare.

§ 125. — Se mai întrebuințează numeroase formule de soluții zise artificiale, cele mai întrebuințate și cunoscute fiind următoarele:

— Lichidul Ringer: NaCl 0,85 g, KCl 0,025 g, $NaHCO_3$ 0,020 g, Apă dist. ad 100 cc. Soluția se pregătește mereu proaspătă, deoarece nu se păstrează.

— Lichidul Tyrode: NaCl 0,85 g (la animalele cu sânge rece 0,65) KCl 0,042 g, $NaHCO_3$ 0,020 g, $CaCl_2$ 0,025 g, Apă dist. ad 100 cc.

Toate aceste soluții se sterilizează prin filtrare pe filtru bacteriologic Jena.

§ 126. — **Tehnica preparatului proaspăt.** Este foarte simplă: se taie cu lama sau foarfeca o porțiune mică a țesutului de studiat și se pune pe lamă, într'o picătură de lichid fiziologic sau artificial. Se disociază apoi, dacă este necesar, cu ajutorul acelor de disociat, totdeauna în lungul fibrelor organului (de exemplu, fibre musculare). După ce s'a obținut rezultatul dorit, se acoperă cu o lamelă. Pentru a evita uscarea preparatului în timpul examenului, sau pentru a-l păstra pentru câtva timp, se recomandă următoarele artificii de tehnică: lipirea preparatului, întrebuințarea unei camere umede, fixarea, colorarea și montarea definitivă a preparatului proaspăt.

§ 127. — **Lipirea preparatului.** Cea mai simplă metodă este aplicarea de parafină solidă, topită în prealabil, cu ajutorul unei sârme îndoite în formă de L. Parafina prinde bine dacă lama și respectiv lamela sunt perfect curățate, însă are marele desavantaj de a fi foarte fragilă. Incontestabil, cea mai bună metodă pentru închiderea preparatelor în mediu lichid folosește amestecul de lanolină 20 g și colofoniu 80 g.

Lanolina se încălzește încet într'o capsulă de porțelan pentru a se lichefia și a pierde cantitatea de apă eventual conținută. Când toată spuma produsă prin evaporarea apei a dispărut, se adaugă colofoniul și se încălzește în continuare, amestecând, până se obține un lichid perfect omogen. Acest amestec se aplică tot cu ajutorul unei sârme îndoite, încălzită în prealabil. El are avantajul că prinde bine chiar pe sticla ușor umezită cu apă, glicerină, lactofenol, alcool, etc.

§ 128. — **Examenul în cameră umedă.** Cea mai simplă modalitate este examenul zis în « picătură suspendată », în care obiectul de examinat se pune pe o lamelă, care apoi *se întoarce* cu picătura în jos, peste o lamă cu concavitate centrală sau peste o celulă formată dintr'un pătrat gros de carton sau un inel de sticlă, ambele lipite cu balsam de Canada pe lamă. Este bine ca lamela să se lipească pe margini.

Pentru examenul cu obiective uscate puternice sau obiective cu imersie se întrebuințează o cameră umedă formată dintr'o celulă exterioară și un disc central așezat cu $^1/_{10}$ mm mai jos.

§ 129. — **Fixarea și montarea preparatului proaspăt.** Pentru a putea colora și monta un preparat proaspăt fără a-l strica se recomandă în primul rând *fixarea*. Aceasta se face cu vapori de iod, de acid osmic sau cu vapori de formol.

§ 130. — **Procedeul cu iod.** Se încălzesc într'o eprubetă câteva cristale de iod metaloidic până ce apar vapori. Se răstoarnă apoi eprubeta cu gura în jos către preparatul care se găsește într'o cutie Petri. Vaporii de iod, fiind mai grei decât aerul, cad și fixează instantaneu obiectul. După 2—3 minute se încălzește și lama cu obiectul la circa 40° pentru a elimina excesul de iod.

§ 131. — **Procedeul cu acid osmic.** Intr'o cutie Petri se picură 1—2 picături de acid osmic 1—2%, apoi se închide cât mai bine. Vaporii fixează celulele sau frotiurile subțiri în $^1/_2$—1 minut, frotiuri mai groase sau membrane în 1—3 ore. Se va evita suprafixarea.

§ 132. — **Procedeul cu formol.** Se pune o hârtie de filtru pe fundul unei cutii Petri și se umezește din plin cu formol concentrat (40%). Se închide bine cutia. Vaporii de formol fixează țesuturile în circa $^1/_2$—1 oră.

§ 133. — **Deshidratarea.** Se pune lama cu preparatul fixat ca mai sus, într'un cristalizor care se închide ermetic, pe un mic piedestal (de exemplu, două bucăți de baghetă de sticlă mai groase). Se picură pe lamă alcool de 20°, iar în fundul cristalizorului se pune alcool absolut în care mai există suspendat praf alb de sulfat de cupru calcinat (care nu s'a hidratat). Se închide bine capacul și se pune într'un loc ferit de lumină. După trecerea câtorva zile, alcoolul de pe lamă s'a concentrat îndeajuns pentru ca să se poată picura cu atenție pe lamă 1—2 picături de sol. 1% de celoidină. De îndată ce această celoidină s'a întărit, se trece lama în alcool de 80°, unde se prinde o peliculă de celoidină, care permite colorarea ulterioară a țesutului de pe lamă, împiedicând desprinderea în soluțiile colorante. După colorare, înaintea montării în balsam, se va evita trecerea în alcool etilic absolut, alcool izopropilic, xilen fenolat sau terpineol, care pot disolva celoidina.

COLORAȚIILE VITALE, SUPRAVITALE ȘI POSTVITALE

§ 134. — Termenul generic de « colorație vitală » se aplică fără prea mult discernământ, la diferite metode de colorare, care nu au nimic comun una cu alta. In realitate, « colorația vitală » este o acumulare întâmplătoare de particule inerte în citoplasma celulelor, și în special a unor anumite celule, cele ale sistemului reticulo-histiocitar.

§ 135. — Colorația « supravitală » este o acumulare a unor anumiți coloranți, cei electropozitivi, în zone speciale ale celulelor (vacuom-condriom), acumulare care se produce în aproape toate celulele, fără ca acestea să aparțină unui sistem anumit, cu funcții sau comportări speciale.

§ 136. — Mai există și o a treia varietate de colorație, care are un obiect special: este vorba de colorația zisă « vitală » și « postvitală » a terminațiilor nervoase din organe, care se pun în evidență cu ajutorul albastrului de metilen. In cele ce urmează ne vom ocupa de primele două grupe de metode, iar pentru cea de a treia, colorarea terminațiilor nervoase, trimitem la capitolul « Țesut nervos » (§ 1054).

§ 137. — In această metodă se injectează animalului de experiență suspensiile inerte menționate mai jos, pe care anumite celule sau țesuturi le fagocitează sau acumulează.

§ 138. — **Calea de injecție.** Coloranții zișI « vitali » și substanțele inerte se pot injecta animalului pe trei căi: *a)* intravenos, *b)* intraperitoneal, *c)* subcutanat. In prima eventualitate, dozajul are o mare importanță; în celelalte două eventualități, dozarea are o importanță secundară, dându-se preferință însă cantităților mai mari. Aceste trei căi sunt cele obișnuite pentru studii generale, însă se mai injectează coloranți vitali și în alte cavități ale corpului, cum ar fi de exemplu sacul pleural sau trahea, dacă necesitățile experimentale o cer.

§ 139. — **Substanțele utilizate** în tehnicile vitale se pot încadra în următoarele patru clase:

1. Suspensii simple apoase de material inert, ca de exemplu: negru de fum, tuș, carmin, grafit, metale.

2. Suspensii coloidale ale acelorași substanțe: negru de fum și gelatină, tuș, carmin litinat.

3. Suspensii coloidale de aur sau argint: în special protargol, argirol.

4. Suspensii coloidale ale coloranților derivați din benzidină: albastru tripan, albastru de isamină, albastru pirol, roșu tripan, roșu diamin rapid, negru clorazol E.

§ 140. — **Specificitatea substanțelor utilizate**

1. *Fagocitele*: dacă se urmărește colorarea fagocitelor, oricare din materialele menționate mai sus poate fi întrebuințat, injectarea făcându-se pe căile menționate sau în imediata vecinătate a celulelor de studiat.

2. *Leucocitele*: majoritatea substanțelor de care am vorbit și în special particulele de cărbune coloidal injectate intravenos sunt fagocitate de monocite. Granulocitele ingeră rareori particule, cu excepția coloranților derivați din benzidină, pe care de altfel nu îi prind decât în anumite ocazii, cum ar fi stagnarea circulației sanguine. Granulocitele pot fi văzute cu particule de colorant în ele, în trombi sau în exudate pneumonice. In aceste cazuri se produce însă o colorație foarte vie a granulațiilor leucocitelor, ceeace ar sugera un mecanism de colorare diferit de fagocitoză.

3. *Țesutul conjunctiv*: fibroblaștii se colorează cu majoritatea substanțelor citate, în special dacă injecțiile s'au repetat mult timp.

4. *Endoteliul vascular* nu prinde de regulă particulele colorante, cu excepția cărbunelui în suspensie coloidală. Endoteliul vascular inflamat este în mod regulat impregnat cu cărbune coloidal; astfel se pot vedea particulele de cărbune aderente pe suprafața lui și apoi înglobate în mod gradat de citoplasmă. Celulele Kupffer din capilarele hepatice fagocitează cu ușurință toți coloranții vitali, ceeace duce la concluzia că ele ar fi oarecum diferite de endoteliul vascular obișnuit.

5. *Celulele epiteliale*: dacă injectarea depăşeşte anumite limite, oricare din substanţele de mai sus va putea fi regăsită în celulele hepatice, de exemplu. Coloranţii derivaţi din benzidină şi carminul litinat, care sunt excretate de rinichi, colorează epiteliul tubilor contorţi. In alte ocazii, celulele epiteliale nu se colorează cu coloranţii menţionaţi.

§ 141. — Indicaţiile coloraţiilor vitale. Toate aceste metode se întrebuinţează pentru punerea în evidenţă a reticulo-endoteliilor, ca de pildă histiocitele sau celulele mobile ale ţesutului conjunctiv.

Endoteliul vascular se studiază cu ajutorul suspensiilor de cărbune coloidal. Regiunile excretoare sau absorbante ale rinichiului pot fi studiate cu ajutorul acestor coloranţi. Wislocky a descris în 1921 o metodă de studiu aproape cantitativ al măduvei oaselor, care se bazează pe fagocitarea unor particule de cărbune de către numeroasele celule fagocitare sau reticulo-endoteliale ale măduvei, iar apoi clarificarea osului după metoda Spalteholz. Prin această clarificare se poate studia distribuţia ţesutului medular, care e negru şi opac. Coloranţii derivaţi din benzidină mai pot servi şi în embriologie pentru studiul absorbţiei lichidului amniotic sau al altor lichide.

Coloraţia vitală se face după următoarele tehnici:

§ 142. — Suspensii simple apoase. Heidenhain recomandă o suspensie 0,4% de *indigocarmin* pentru injecţii intravenoase, din care se injectează 30—60 cc la iepure, 150—1500 cc la câine (după dimensiune).

Karsner injectează intrapleural 15—25 cc suspensie apoasă de *carmin* sau *negru de fum* (bine filtrate).

Se mai preconizează şi *zaharatul de oxid de fier*. Acest compus se injectează: *a)* la şoarece 0,3 cc din sol. 10%; *b)* la iepure 5 cc. din sol 25%. La recoltare, organul se fixează în formol 20% sau alcool absolut. Compusul de fier se pune în evidenţă pe secţiuni prin metodele albastrului de Prusia, Turnbull, etc., iar nucleii se colorează cu carmin alaunat sau paracarmin.

§ 143. — Suspensiile coloidale de materiale inerte. Suspensiile de materiale inerte pot fi făcute coloidale în soluţii de gumă arabică sau gelatină, în care caz acţiunea lor devine mai precisă şi ele capătă o afinitate specială pentru monocite şi endoteliul vascular. Acest lucru e în special valabil pentru particulele de cărbune (negru de fum). Varietăţile de cărbune coloidal mai uzuale sunt următoarele:

§ 144. — Cerneala Higgins este o suspensie de carbon (negru de fum) foarte fin, în soluţie diluată de gumă arabică şi care conţine puţin camfor, pentru a o feri de microorganisme. Se diluează cu un volum egal de apă distilată, se încălzeşte la temperatura corpului animalului. Se injectează la iepure câte 5 cc în vena marginală a urechii, timp de 3—4 zile zilnic, iar apoi la câte 3 zile. Injectarea venei se începe cât mai la margine posibil, iar locul injecţiilor se apropie din ce în ce de baza urechii, de capul iepurelui, pentru a păstra cât mai mult timp posibil vena netrombozată.

§ 145. — Negrul de fum coloidal. Se triturează bine într'un mojar o cantitate de negru de fum comercial. Se pun apoi 0,4 g în 100 cc de apă gelatinată 2%. Pentru a mări afinitatea monocitelor pentru cărbunele coloidal, se preconizează injectarea simultană a 5—9 cc de citrat de sodiu 10%.

§ 146. — Carminul litinat este bine reţinut şi rezistă la deshidratarea cu alcool a pieselor, în vederea includerii. Este însă mai toxic, în special pentru anumite specii animale. Modul de preparare: se pun 2,5 g carmin în 100 cc soluţie apoasă saturată de carbonat de litiu. Se fierbe pe baia de apă timp de 10—15 minute. Apoi se filtrează cu grijă şi se sterilizează. Acest amestec constitue « soluţia mamă ».

Soluţia se utilizează astfel: *a) la şoarece* se injectează intravenos în vena cozii 0,2 cc soluţie mamă diluată 20%. La următoarele injecţii zilnice se creşte concentraţia. O coloraţie vitală generală se obţine în 6—8 zile; *b) la iepure* se injectează intravenos câte 10 cc din soluţia mamă diluată 10%.

Tratamentul ulterior al pieselor. Dacă intenţionăm să facem secţiuni la ghiaţă, fixarea se face în formol 10%; pentru secţiuni la parafină se fixează în alcool 95°, formol-sublimat, formol 10%. Colorare în hemalaun sau albastru de metilen.

§ 147. — Suspensiile coloidale de aur sau argint nu prezintă niciun fel de avantaje asupra celorlalte metode; deaceea, fiind în plus şi mult mai scumpe, nu mai sunt întrebuinţate.

§ 148. — Suspensii de coloranţi derivaţi de benzidină. Colorantul cel mai întrebuinţat, deoarece este cel mai puţin toxic, este *albastrul tripan* (sinonim albastru Niagara 2 B). Se fac suspensii 0,5—1 g % în apă distilată. Se încălzesc 10 minute la temperatura de fierbere pentru a steriliza soluţia. Soluţiile vechi (aproximativ 1 lună dela preparare) devin toxice, prin modificări coloidale. Este preferabil să se păstreze soluţia la rece. Se injectează subcutanat, intravenos sau intraperitoneal la intervale de 3—5 zile, astfel: *a)* şoarece (20 g) câte 0,5—1 cc; *b)* iepure (de 1 kg) câte 10—15 cc; *c)* broască (20 g) câte 0,5—1 cc.

Animalul se sacrifică la 24 de ore după ultima injecţie.

§ 149. — Tratamentul ulterior al pieselor prevede secţionarea la congelare sau după includere în parafină. 1) Secţiunile la ghiaţă se fac după fixarea în formol 10—15% timp de 12—24 de ore. 2) Se supracolorează secţiunile timp de 30—50 de *secunde* în amestecul: roşu neutru 1 gr, apă distilată 1000 cc, acid acetic 1% 2 cc. 3) Clătire în apă distilată. Deshidratare în alcool absolut. Clarificare în xilen.

§ 150. — O metodă care dă secţiuni frumoase este următoarea:

1) După fixare în formol, secţionare la ghiaţă. 2) Colorarea în amestecul de roşu neutru de mai sus sau într'o soluţie de verde rapid. 3) Spălare în apă distilată. Scurgere pe hârtie de filtru. 4) Trecere în două băi de dioxan curat, câte 5—10 minute fiecare, clarificare în xilen, montare în balsam. Alţi autori preconizează, în loc de formol, fixarea în următorul

amestec: sol. 1% de acetat de plumb 50 cc, formol 25 cc, apă dist. 15 cc.

§ 151. — Granulațiile de tripan din țesuturi pot suporta și includerea la parafină, fără să se decoloreze, cu condiția ca fixarea să fie bună. Se preconizează fixarea în Bouin, Susa sau în amestecul: soluție apoasă saturată de sublimat 8,5 părți, formol concentrat (40 volume) 1 parte, în care piesele stau după mărime 1—24 de ore.

Piesele care conțin țesut osos stau în amestecurile conținând acid tricloracetic până se decalcifică. Piesele nu trebue tratate cu iod, pentru a scoate precipitatele de sublimat, deoarece iodul disolvă și decolorează tripanul! Se trece direct în alcool de 80—90°, schimbat de mai multe ori, eventual includere prin metoda cu dioxan.

Kiyono recomandă amestecul său fixator: sol. 10% acetat de plumb 50 cc, sol. apoasă saturată de sublimat 50 cc (apă dist. 100 cc, NaCl 0,6 g + $HgCl_2$ 9 g), ac. acetic 1—2 cc (necesar pentru a redisolva precipitatul care se produce din amestecul de sublimat și acetat de plumb). Timp de fixare 12—24 de ore.

Colorarea secțiunilor la parafină din organele injectate cu tripan se face în special cu carmalaun preparat din: acid carminic *(nu carmin)* 2 g; alaun de amoniu 20 g, glicerină 150 g, apă dist. 150 cc. Se disolvă la cald alaunul în apă, apoi se adaugă acidul carminic. La răcire se pune glicerină, apoi se filtrează.

Se mai pot colora secțiunile și cu Kernechtrot.

§ 152. — **Negrul clorazol E** se întrebuințează în soluție 1% fiartă și răcită. Se injectează la șoarece câte 1 cc subcutanat zilnic, timp de 7 zile. Fixarea țesuturilor în Zenker la 24 de ore după ultima injecție. Colorarea cu safranină-oranj G.

§ 153. — **Roșul diamin rapid** se păstrează bine în țesuturi după fixare în Bouin sau sublimat. Se injectează: *a)* șoarece (de 20 g) 0,5—1 cc din sol. 1%; *b)* iepure (de 1000 g) 20 cc din sol. 5%.

COLORAȚII SUPRAVITALE CU COLORANȚI ELECTRO-POZITIVI

§ 154. — După cum am mai spus la începutul acestui capitol, colorarea supravitală are drept scop să facă să apară anumite părți ale celulei, nucleul sau enclavele citoplasmice, fără însă să aducă mai înainte moartea celulei examinate, prin modificările fizice sau chimice ce ar fi produse de colorant. Campbell (1886) arată că nucleii unor celule la plante pot fi colorați supravitali cu violet de metil sau violet dalia, fără ca această colorare să se opună în vreun fel diviziunilor celulare ulterioare. In cazul celulelor animale, însă, colorarea supravitală duce în cele din urmă la moartea celulei. Din acest motiv, coloranții vitali trebue aleși dintre substanțele puțin toxice, care se vor întrebuința în soluții foarte diluate. Aceste substanțe trebue să întrunească în plus încă un număr

de calități necesare modului de producere a colorației. Astfel, un atribut important este solubilitatea colorantului în lipide și în special în colesterol și lecitină, care impregnează pelicula citoplasmică externă a celulelor. Cercetările de chimie a coloranților au arătat că într'adevăr coloranții bazici, grup în care se pot clasifica aproape toți coloranții vitali, sunt solubili în lipide. Coloranții acizi sunt în schimb greu solubili în lipide și acesta ar fi unul din motivele pentru care, cu câteva excepții, ei nu sunt coloranți vitali.

§ 155. — Alt factor important în colorațiile vitale este încărcarea electrică pozitivă sau negativă a colorantului care acționează totdeauna în soluții coloidale asupra unui mediu care e și el coloidal (citoplasma). Cele mai mici transformări ale mediului intern celular își au corespondența în coloratia vitală, care astfel devine expresia echilibrului coloizilor și electroliților celulari.

Pe de altă parte, elementele vii acționează și ele chimic asupra colorantului; astfel, spre exemplu, albastrul de metilen este transformat prin reducere într'un leucoderivat, în citoplasmă, și este apoi regenerat la nivelul vacuomului. Dacă țesutul este aerat artificial, albastrul devine aparent, prin oxigenare, și la nivelul condriomului. Acelaș lucru se petrece și cu verdele Janus care e redus în dietilsafranină, de culoare roz, sau într'un produs incolor. Aceasta este explicația faptului pentru

Animalul	Indigocarmin 0,4%	Zaharat de fer 10—25%	Tuș coloidal	Carmin litinat 2,5%	Tripan 0,5—1%	Negru clorazol E 1%	Roșu diamin 1—5%
Șoarece (20 g)		0,3 cc sol. 10%		0,2 cc sol. diluată i.v. Timp: 6-8 zile zilnic	0,5—1 cc la 3—5 zile sub. cut., i.v. i. perit.	1 cc zilnic. Timp: 7 zile subcut.	0,5—1 cc sol. 1%
		5 cc sol. 25%	5 cc i. v. zilnic, timp de 3—4 zile, apoi la 3 zile	10 cc sol 1/10 i.v., 6—8 zile zilnic	10—15 cc la 3—5 zile s. cut., i.v. i. perit.		20 cc sol. 5%
Iepure (1000 g)	30—60 cc						
Câine	150—1500	după dimens.	după dimens.	după dimens.	după dimens.		

care, în cursul coloraţiei vitale, condriomul nu apare colorat decât după oxigenare prealabilă.

§ 156. — Coloranţii vitali pot acţiona direct asupra celulelor şi ţesuturilor unui animal viu, în care caz coloraţia este denumită « intravitală », sau asupra unor fragmente de ţesut sau celule separate din organism, însă ce se mai găsesc în stare vie, când se numeşte « postvitală ».

Coloraţia supra- şi postvitală nu este propriu zis o « colorare » în sensul propriu al cuvântului, ci este o acumulare de colorant în porţiuni speciale ale celulei.

§ 157. — Coloranţii vitali bazici (electropozitivi), ca roşul neutru, albastrul de metilen, albastrul de Nil, albastrul de crezil, violetul de metil, violetul de crezil, etc. pot colora toate celulele în timp ce coloranţii acizi (electronegativi) ca albastrul sau roşul tripan sau albastrul pirol se fixează doar în anumite celule (S.R.H.). Deasemenea, aceşti coloranţi din urmă sunt acumulaţi, precipitaţi la întâmplare în interiorul celulei, pe când cei bazici se fixează pe elemente preformate.

Coloraţiile postvitale nu sunt posibile cu coloranţii acizi.

§ 158. — Dacă observăm la microscop etapele unei coloraţii supravitale, vom vedea că celula trece prin următoarele trei stadii:

a) *Coloraţia difuză primară*: se poate observa mai uşor la roşul neutru şi este o coloraţie instantanee şi fugace, deoarece colorantul este apoi repede localizat de vacuom.

b) *Coloraţia vacuomului şi condriomului*: constitue coloraţia vitală propriu zisă. Acest stadiu durează atâta timp cât viaţa celulară şi se poate însoţi de fenomene de reducere ale colorantului.

c) *Coloraţia difuză secundară* sau subletală se produce puţin înaintea morţii celulei. Vacuolele se decolorează, colorantul difuzează din nou în citoplasmă şi aspectul devine cel al unui element mort, asemănător aspectului celulei colorate după fixare.

§ 159. — Trebue menţionate aci o serie de fapte interesante în legătură cu coloranţii vitali bazici. In acest grup sunt cuprinşi diverşi coloranţi: unii care pun în evidenţă un singur gen de elemente, de exemplu verdele Janus, care colorează condriomul. Albastrul de metilen colorează şi el condriomul însă pe lângă acest mod de colorare el mai pune în evidenţă în mod electiv şi celulele centro-acinoase din acinul pancreatic, atunci când este injectat în vasele pancreasului, într'o concentraţie de 1/10 000. Roşul neutru colorează patru tipuri de elemente intracelulare: anumite granulaţii ale citoplasmei, ca de pildă granulaţiile specifice ale leucocitelor neutrofile, bazofile, eozinofile, amfofile, sau granulaţii de secreţie ca cele din celulele acinului pancreatic; în interiorul vacuolelor de digestie ale fagocitelor; roşul neutru pune în evidenţă aparatul canalicular din celulele parietale ale glandelor fundice din stomac, deasemenea colorează electiv substanţa bazofilă din eritrocitele tinere (reticulocite), dând tablouri similare celor produse de albastrul de crezil-briliant.

Colorarea vitală a condriomului

§ 160. — **Coloraţia cu albastru de metilen.** Este de dorit să se întrebuinţeze un albastru de metilen pur pro- analisi. Pentru colorarea vitală a protozoarelor sau cea postvitală a bucăţilor de membrană sau a celulelor raclate de pe mucoase se fac soluţii 1/500—1/1 000—1/10 000. Pentru colorarea vitală a condriomului la vertebrate se procedează astfel: 1) Se injectează în sacul limfatic dorsal la broască 1 cc din sol. 1% albastru de metilen; 2) după 24 de ore animalul se sacrifică şi se strivesc între lamă şi lamelă bucăţele de rinichi. Condriomul celulelor secretoare renale e colorat în albastru.

§ 161. — Există şi modalitatea de a obţine secţiuni la parafină prin următoarea tehnică: 1) fragmentele de rinichi colorate ca mai sus se fixează în amestecul : sol. apoasă saturată acid picric 60 cc, formol 40% 20 cc, sol. apoasă saturată de molibdat de amoniu 20 cc, apoi 2) se includ la parafină, se taie şi 3) se colorează nucleii cu safranină. Rezultate: glomerulii apar incolori, celulele cu margine în perie şi celulele cu bastonaşe prezintă condriomul colorat în albastru.

§ 162. — Pentru a colora condriomul în celulele cartilaginoase la câine, Turchini şi Slobozianu procedează astfel: se injectează 5 cc sol. albastru de metilen 1% în plămân. După 6 ore se sacrifică animalul şi se examinează cartilajele bronşice.

§ 163. — **Coloraţia cu verde Janus.** Verdele Janus (verde diazină) este cel mai bun colorant al condriomului, când se întrebuinţează postvital. Un procedeu bun este următorul: 1) se pune un mic fragment de ţesut pe o lamă, într'o picătură de verde Janus 0,33%, atât cât să nu fie acoperit; 2) după 30 de minute, timp în care se oxigenează, se acoperă cu o lamelă. Dacă condriocontele nu sunt vizibile se schimbă soluţia cu una mai concentrată. Diluţia optimă e de obicei cea de 0,5%.

§ 164. — In grupul coloranţilor vitali ai condriomului mai trebue amintite următoarele substanţe: verde de metil, verde de iod, verde malachit, albastru Victoria, violet cristal, violet Hoffman, violet de genţiană, violet dalia, violet de metil 5 B.

Tehnica colorării vitale a sângelui

§ 165. — In această metodă se întrebuinţează roşul neutru şi verdele Janus. Aceşti coloranţi, fie amestecaţi, fie câte unul, sunt disolvaţi în alcool absolut, apoi se face cu ajutorul lor un frotiu pe lamă, care se usucă. Pe deasupra se face frotiul de sânge, ale cărui elemente se colorează vital.

§ 166. — Pentru reuşita acestor importante metode este necesară observarea riguroasă a următoarelor puncte: 1) alcool absolut perfect neutru *obţinut prin distilare* (nu prin sulfat de cupru calcinat), fiindcă

cele mai mici variații de pH împiedică colorarea vitală a celulelor; 2) coloranți foarte puri «pentru colorații vitale».

§ 167. — Soluțiile utilizate pentru facerea frotiurilor sunt în general foarte diluate, și pentru a evita cântărirea unor cantități foarte mici de colorant este preferabil să se plece dela soluții-mamă saturate din care se fac diluțiile necesare. Soluția de roșu neutru e de 125 mg la 50 cc alcool absolut neutru, iar cea de verde Janus de 125 mg la 62,5 cc alcool absolut. Este bine ca diluția să nu depășească 5 — 10 cc, deoarece praful introdus în soluție poate strica întreaga cantitate.

Pentru a face amestecul de roșu neutru și verde Janus se ia 1,1 cc soluție saturată de roșu neutru și se adaugă 10 cc alcool absolut; din această soluție diluată se iau 3 cc la care se adaugă 0,04 cc sol. saturată de verde Janus. Această combinație trebue neapărat utilizată în ziua preparării.

§ 168. — Pentru a prepara lamele, se iau lame bine degresate, chimic curate, și se țin oblic deasupra unui cristalizor. Se picură amestecul, iar excesul se scurge pe o hârtie de filtru. Se usucă lama într'un curent de aer cald. Pe lama uscată nu trebue să se vadă urme de colorant, căci o concentrație prea mare omoară celulele. Suprafața colorată trebue marcată cu un creion de scris pe sticlă.

§ 169. — Trebue observat că verdele Janus este mai toxic decât roșul neutru și inhibă motilitatea celulelor. Deaceea, în anumite cazuri, cum ar fi discriminarea mielocitelor și monocitelor în diagnosticul leucemiei monocitare, se va utiliza doar roșul neutru.

§ 170. — Colorarea supravitală a sângelui, ca și cea a altor celule, poate fi permanentizată prin fixare fie în formol-Ringer tamponat la pH sanguin, fie în Zenker-formol.

Curent se procedează astfel: 1) pe o lamă preparată cu colorant și uscată se pune o picătură proaspătă de sânge, destul de mică pentru a nu trece de marginile lamelei; 2) se aplică apoi o lamelă, care se lipește imediat cu vaselină solidă, topită prin încălzire, cu ajutorul unei seringi cu un ac gros. Preparatul colorat supravital se poate păstra 24 de ore la răcitor.

§ 171. Pentru a număra celulele, temperatura optimă este de 37° și se obține cu o platină microscopică încălzitoare sau o etuvă pentru microscop. Mișcările celulare pot fi observate doar la această temperatură.

Trebue să treacă cel puțin 15 minute pentru a observa lama, deoarece colorația cu verdele Janus se face mult mai încet decât cea cu roșul neutru.

§ 172. — Aplicațiile colorației vitale la sânge

a) *Eritrocitele.* In frotiurile supravitale, reticulul din reticulocite este colorat de roșul neutru. Această colorație este similară celei produse de albastrul de crezil briliant. Totuși, numărarea reticulocitelor nu este prea precisă întrucât concentrația de colorant adaptată la colorarea leucocitelor nu este cea optimă pentru reticulocite. Acest lucru este confirmat de faptul că majoritatea reticulocitelor se găsesc la marginile preparatului, adică acolo unde concentrația colorantului e mai mare.

b) *Granulocitele.* Se pot efectua formule leucocitare pe frotiuri colorate vital. Trebue observat însă că formula calculată cu ajutorul colorației vitale este mai apropiată de realitatea de fapt din sângele circulant, spre deosebire de formula făcută pe frotiu colorat, unde se distrug numeroase elemente prin întinderea pe lamă.

— *Granulațiile neutrofile*, amfofile și pseudoeozinofile se colorează în mod caracteristic în roșu portocaliu cu ajutorul roșului neutru. Ele prezintă nuanța neutră a colorantului, iar în cazul granulațiilor pseudoeozinofile, o reacție ceva mai acidă. Prin colorarea vitală cu roșu neutru, granulațiile sunt foarte bine evidențiate.

Pe lângă granulațiile specifice se mai pot observa în granulocitele neutrofile și numeroase vacuole pline cu roșu neutru și care indică fagocitoza. Ele au o culoare mai către zona acidă a colorantului și dimensiuni mai mari decât granulațiile.

Se mai pot observa și mitocondrii, care sunt de dimensiuni mici și se colorează cu verde Janus. In formele bătrâne ele se împuținează, și dispar cu totul în leucocitele senile.

La temperatura de 37°, necesară pentru observație, granulocitele neutrofile sunt în permanentă mișcare ameboidă, ceeace este un excelent criteriu de diferențiere față de limfocite sau monocite, care prezintă tipuri diferite de motilitate.

— *Granulațiile bazofile* se colorează tot în zona acidă a roșului neutru. Ele nu sunt uniforme ca mărime, iar intensitatea colorării e diferită. Granulocitul bazofil are mișcări ameboide intense, dar bazofilul tisular — «mastocit» — este aproape imobil, ca și mielocitul.

— *Granulațiile eozinofilelor* sunt mari, refringente, dau o reacție caracteristică în zona alcalină a roșului neutru, în galben-clar. La cobai se pot găsi mici granule bazofile în celulele eozinofile. Eozinofilele prezintă și ele mișcări ameboide, care însă se mențin mai scurt timp la 37°.

c) *Limfocitele.* Caracteristica limfocitelor este citoplasma clară și plină de mitocondrii, în formă de bastonaș. Motilitatea este caracteristică, nucleul se găsește în partea *anterioară* a celulei (în direcția mișcării). Limfocitul nu este în continuă mișcare, el înaintează puțin, apoi rămâne pe loc.

d) *Monocitele.* Tehnica supravitală este un avantaj special pentru discriminarea monocitelor. Ele au o citoplasmă mai densă, cu vacuole care reacționează la roșu neutru, în zona lui mai acidă. Aceste vacuole sunt așezate la animal în formă de rozetă în jurul centrozomului; la om ele sunt mai împrăștiate. Mitocondriile sunt mici și numeroase și, la animal, aranjate în unghiurile rozetei formate de vacuole. Vacuo-

lele de dimensiuni mari sunt crescute ca număr în febra de Malta. Se mai poate observa şi o creştere în vacuolele de dimensiuni mici, de exemplu, în tuberculoză, unde se pot observa stadiile de tranziţie între monocit şi celulele de tip epitelioid.

e) *Celulele leucemice.* Amestecul de roşu neutru-verde Janus e un colorant foarte potrivit pentru sângele cu numeroase forme tinere. Mieloblaştii se caracterizează prin numeroase mitocondrii mici, împrăştiate difuz în citoplasma bazofilă. Pentru a-i diferenţia de promielocite este necesar un preparat colorat pentru oxidaze, în care caz promielocitele prezintă cel puţin câteva granule oxidazice pozitive. O discriminare greu de făcut este cea dintre monocit şi mielocit, când acesta nu are încă granulaţii numeroase. Ambele tipuri celulare fiind oxidazopozitive, studiul motilităţii are o mare importanţă.

f) *Celulele măduvei hematogene.* Colorarea cu coloranţi vitali în amestec este o metodă importantă pentru a putea face mielograme.

§ 173. — **Colorarea vitală a exudatelor după Şmeliov-Vollsen** se face cu un amestec de 0,5 cc roşu neutru 2% în alcool absolut şi 0,2 cc verde Janus 2% în alcool absolut. Pe lame curăţite se întinde un frotiu de amestec. Se picură apoi lichid pleural şi se acoperă cu lamela. Lipirea periferiilor lamelei cu parafină. Examen la imersie. Elementele celulare prezintă caracterele obişnuite.

FIXAREA ŞI FIXATORII

§ 174. — Fixarea este operaţia care urmăreşte să oprească procesul de descompunere a ţesuturilor după scoaterea lor din organism, adică după întreruperea legăturilor lor neuro-vasculare. În acest scop, fixarea omoară celulele, păstrând pe cât posibil structura lor din timpul vieţii.

In structura ţesuturilor şi celulelor intră o mare cantitate de apă (70—80%), circa 12% proteine şi 7% lipide şi lipoide. In materia vie, proteinele formează de obicei cu lipidele cenapse lipido-protidice, formând faza dispersă a unui sol coloidal în care apa reprezintă mediul de dispersie. Păstrarea formei şi infrastructurilor în cursul fixării nu se poate obţine decât cu preţul întreruperii proceselor intracelulare, al mişcării continue a particulelor coloidale, prin imobilizarea, unele faţă de celelalte, a moleculelor şi miceliilor coloidale.

In acest scop se utilizează de cele mai multe ori soluţii cu proprietăţi speciale *lichide fixatoare*, simple sau complexe (amestecuri). Unele dintre acestea coagulează materia proteică, modificând starea ei fizică, fără să-i altereze compoziţia; altele produc modificări chimice în structura cenapselor lipido-protidice, modificări care stau la baza precipitării, a separării fazei disperse de mediul de dispersie. In fine, după fixare

apar multe infrastructuri, mascate în stare vie. Deasemenea apar şi artefacte, mai ales atunci când nu se folosesc fixatorii cei mai potriviţi pentru scopul urmărit.

§ 175. — **Proprietăţile generale ale fixatorilor.** Pentru a putea fi utilizată ca fixator, o substanţă sau un amestec de substanţe trebue să prezinte următoarele proprietăţi mai importante: *a)* să omoare rapid celulele şi să pătrundă repede în ţesuturi; *b)* să modifice cât mai puţin structurile naturale şi să nu creeze artefacte; *c)* să confere ţesuturilor fixate o consistenţă şi o resolubilitate suficiente pentru a permite trecerea materialului fixat prin diferiţii reactivi, trecere care premerge efectuarea secţiunilor; *d)* să permită, să favorizeze sau să nu împiedice colorarea electivă a ţesuturilor şi a componentelor acestora.

Fixatorii sunt mai mult sau mai puţin penetranţi. Ei fixează bine un organ celular şi nu fixează un altul: astfel, bicromaţii alcalini conservă structurile citoplasmice, dar nu şi cele nucleare. Dimpotrivă, acidul acetic fixează bine cromatina, dar nu şi citoplasmele.

§ 176. — **Difuzibilitatea fixatorilor.** O proprietate importantă a lichidelor fixatoare este difuzibilitatea lor în ţesuturi, penetrabilitatea lor. Această proprietate depinde însă nu numai de compoziţia fixatorului, ci şi de structura ţesutului care este fixat. In general, parenchimele sunt pătrunse mai uşor decât ţesutul conjunctiv. Atunci când viteza de penetrare a fixatorului este mică este preferabil să se debiteze piesa în fragmente mici şi subţiri.

§ 177. — In cursul pătrunderii fixatorului, primele proteine coagulate sau precipitate constitue o barieră care îngreunează difuzarea fixatorului mai departe, aşa încât viteza descreşte cu grosimea piesei. Acest fenomen este aparent mai ales pentru fixatorii care pătrund lent (tetraoxidul de osmiu, acidul cromic, etc.): deaceea, după aceste fixări sunt utilizabile numai zonele periferice ale fragmentului de ţesut, singurele bine fixate. In cazul fixatorilor cu penetrabilitate mare (acid tricloracetic, acid acetic, sublimat), acest fenomen este greu de observat, pentrucă întregul fragment este fixat repede.

Din aceste fapte reiese însă o concluzie foarte importantă:

Pentru a putea asigura o bună fixare, piesa va trebui să fie mică sau în tot cazul subţire şi întreaga sa suprafaţă va trebui să se găsească în contact cu fixatorul. Deaceea, piesa trebue să plutească în lichidul fixator, să fie suspendată în el, sau aşezată pe vată de sticlă, hârtie de filtru sau sită de porţelan.

§ 178. — Difuzibilitatea fixatorilor a fost studiată destul de precis în ultimul timp (vezi mai departe, la fiecare în parte, datele lui Tellyesniczky). Pentru fixatorii anhidri s'au stabilit următoarele date comparative: alcoolul metilic pătrunde mai repede decât amestecul alcool etilic + acid acetic; amestecul alcool etilic + acid acetic + cloroform pătrunde mai repede decât alcoolul etilic; acetona mai repede decât dio-

xanul şi acesta mai repede decât alcoolul propilic. Amestecul acetonă+ cloroform pătrunde mai repede decât acetona, etc.

Viteza de pătrundere a fixatorilor în ţesuturi depinde de vîscozitate, de constanta dielectrică, de dipolmoment şi probabil şi de concentraţia ionilor de hidrogen în ţesutul de fixat.

§ 179. — Puterea de precipitare a proteinelor este o altă proprietate variabilă a fixatorilor. Pentru electrolite (sublimat, bicromaţi, etc.) sunt valabile şi în cazul acesta seriile lui Hofmeister. In orice caz, puterea de precipitare a coloizilor citoplasmatici proteici depinde de legăturile acestora cu componenţii lipidici şi glucidici, precum şi cu electrolitele din citoplasmă.

§ 180. — Studiul fixării, făcut pe modelele proteice compuse din histone şi nucleoproteine, a permis stabilirea unei serii de date importante, astfel, caracterele vitale sunt păstrate cel mai bine de tetraoxidul de osmiu. Fixatorii alcoolici nu fixează componentele nucleare. Amestecurile fixatoare care conţin acid acetic determă in apariţia unor structuri nete în nucleu şi membrana nucleară. Acizii nucleici au de suferit în acest proces, sunt deshidrataţi şi, retractându-se, produc structuri scheletale. Componenţii histonici sunt disolvaţi. Unii fixatori au o acţiune disolvantă asupra proteinelor, lipidelor, glucidelor şi sărurilor. Aceste date trebue avute în vedere atât la alegerea fixatorului, cât şi în operaţiile ulterioare pe care le va suporta fragmentul fixat.

§ 181. — Acţiunea precipitantă a alcoolului pare să fie necesară pentru o fixare complectă. După Apathy şi alţi autori, trecerea prin alcool este o condiţie necesară pentru orice bună fixare.

§ 182. — Acţiunea fixatorilor are ca urmare adesea modificări de volum determinând retracţii sau umflări ale pieselor. In alegerea fixatorului trebue să se ţină seamă de această acţiune, cu atât mai mult cu cât retracţia este mai accentuată în cursul includerii în parafină (până la 40 %). Astfel, după fixare în alcool-formol, retracţia finală este de 11 %, după amestecul Bouin 1 %, etc. In cursul fixării cu formol diluat se produce la început o umflare de 5% a ţesuturilor care se retractă apoi, în cursul manipulărilor, cu 20—25 %.

§ 183. — **Izotonia şi concentraţia** fixatorilor au fost deasemenea studiate. Se considera că fixatorii izotonici ar împiedica retracţiile. Cercetările au arătat însă inexactitatea acestei ipoteze. Soluţiile izotonice nu fixează. Pentru a pătrunde în ţesuturi, fixatorul trebue să aibă o presiune osmotică mare, concentraţia electrolitică necesară fiind de 2—4 ori mai mare decât aceea a sângelui.

§ 184. — **pH-ul fixatorului** trebue să fie în general acid (în jurul lui 4). In general, folosirea unor lichide tamponate este superficială, fiindcă schimbul de substanţe dintre ţesut şi fixator modifică compoziţia fixatorului numai în cazul folosirii unei cantităţi reduse de fixator. Deaceea se recomandă ca volumul fixatorului să fie de 20—40 de ori mai mare decât al fragmentului de ţesut.

§ 185. — **Temperatura** la care se face fixarea nu este mai puţin importantă. Fixarea la frigorifer prezintă oarecare avantaje, frigul întârziind autoliza şi diminuând astfel alterările care se produc în ţesuturi până când fixatorul difuzează până la ele. Această practică este de recomandat mai ales în cazul fixatorilor cu pătrundere lentă (amestecurile osmice) sau când piesele sunt mari.

In ceeace priveşte fixarea la 37°, recomandată de unii autori, nu convine decât pieselor foarte mici şi foarte penetrabile. Astfel, când nu strică ţesuturile, fixarea la 37° este inutilă. In practica curentă, fixarea se face la temperatura camerei.

§ 186. — **Durata fixării.** Fixarea nu este un fenomen instantaneu, ci progresiv. Regiunile profunde ale unei piese sunt fixate mai târziu decât cele superficiale. Totodată, combinaţiile dintre proteine şi fixatori necesită un timp oarecare pentru a se produce; deasemenea, ele se modifică cu durata contactului, căpătând afinităţi tinctoriale noi. Astfel, o fixare de 24 de ore într'un amestec de bicromat şi formol va permite o bună colorare a nucleilor, în timp ce prelungirea duratei fixării la câteva zile va modifica bazofilia nucleară şi va favoriza colorarea unor lipoide şi a mitocondriilor.

Durata fixării variază cu compoziţia fiecărui lichid fixator (va fi indicată acolo). Prelungirea menţinerii piesei în fixator după terminarea fixării poate determina producerea unor alterări ale ţesuturilor. Numai unii fixatori (formolul, lichidul Bouin) permit păstrarea mai departe în acelaş lichid a piesei fixate.

§ 187. — *Fixarea* se poate face şi in situ, fără scoaterea ţesuturilor din organism. Narcoza animalului premerge de obicei fixarea. Pentru a evita vasoconstricţia, hidratul de cloral este de preferat (deasemenea, omorîrea animalului cu gaz de iluminat). Inainte de a se introduce fixatorul în artera nutritivă a regiunii respective, vasele acesteia trebue spălate cu o soluţie salină fiziologică încălzită. O spălare prelungită sau făcută la o presiune prea mare determină leziuni ale pereţilor vasculari şi edem.

Fixatorul pătrunde în vas sub o anumită presiune. La început, pentru a goni lichidul de spălare, vasul cu fixator este ţinut timp de 30—60 de secunde la o înălţime de 150—180 cm, apoi înălţimea poate fi redusă la 30—40 cm. Fixatorii cei mai întrebuinţaţi în acest scop sunt amestecurile alcool + formol, Susa, Bouin, etc.

Recoltarea pieselor pentru fixare

§ 188 — Recoltarea este cu siguranţă unul din actele cele mai delicate ale tehnicii histopatologice. Ţesuturile sunt fragile. Traumatismele le distrug sau în orice caz le modifică aspectul. De multe ori recoltarea se face fără atenţie, cu bisturie tocite, cu pense cu dinţi, cu foarfeci neascuţite. Şi dacă histopatologistul este pus, din aceste motive, în dificultate

de a stabili un diagnostic în fața unui asemenea masacru de celule, el este cel considerat vinovat. Deaceea indicațiile pentru o bună recoltare trebue larg difuzate.

Locul recoltării nu este mai puțin lipsit de importanță. Leziunile chiar localizate, nu sunt peste tot la fel; ele sunt caracteristice în unele porțiuni și nu în altele, și sunt mai totdeauna înconjurate de țesuturi mai mult sau mai puțin sănătoase. Astfel, dacă într'o tumoare ulcerată se recoltează dela suprafața ulcerului, pe secțiune se va pune de multe ori diagnosticul de leziune inflamatorie fără neoplazie, iar dacă în cazul unui uter suspect de cancer se recoltează la întâmplare un fragment din buza colului, șansele de a cădea pe leziune sunt destul de mici. Se va căuta în consecință să se recolteze din porțiunile cele mai propice pentru a fi examinate histopatologic.

§ 189. — Recoltarea țesuturilor normale trebue orientată în așa fel încât confecționarea ulterioară a secțiunilor să permită un studiu cât mai complect; astfel, pereții organelor cavitare trebue orientați în așa fel încât să poată fi studiate toate straturile lor. Dimensiunile fragmentelor recoltate trebue deasemenea să fie adecvate scopului urmărit și fixatorului utilizat.

In ceeace privește recoltarea țesuturilor lezate trebue să se aibă vedere cuprinderea în piesă a unei părți cât mai mari din leziune și, în cazul cel mai fericit, întreaga leziune, cu o parte din țesuturile sănătoase înconjurătoare. In fine, dacă recoltarea trebue să se rezume, ca în cazul biopsiilor, la un fragment mai mic, acesta trebue ridicat dela marginea leziunii și nu dela centrul ei, unde de multe ori, prin însăși desvoltarea leziunii, sunt mai frecvente necrozele.

§ 190. — Recoltarea trebue făcută cu ajutorul unor instrumente cât mai fine, care să taie bine și să nu strivească piesa (lame de ras, brice cu lama subțire și bine ascuțite). Se va evita exercitarea unei presiuni asupra piesei. Dacă țesutul este prea moale și recoltarea fragmentului pentru fixare nu se poate face fără riscul traumatizării țesutului prin presiune, este preferabil să se fixeze timp de 1—2 ore piesa întreagă în formol 15—25%, în care timp straturile superficiale se întăresc. După aceea recoltarea devine posibilă cu mai puține riscuri și fragmentul poate fi trecut în fixatorul adecvat.

Piesele trebue tăiate în felii cât mai mari posibil, cu fețe plane și paralele, și orientate în așa fel, încât aceste fețe să fie paralele cu viitorul plan de secționare. Din nodulii sferici sau ovoizi — un adenom, de exemplu — se fac de obicei două sau trei fragmente, două paralele cu centrul piesei și una perpendiculară pe ele. In cazul leziunilor de suprafață, secțiunea trebue să cadă perpendicular pe suprafață, să depășească limitele macroscopice superficiale și profunde ale leziunii. Așa se procedează de exemplu în cazul cancerelor pielei.

Dimensiunile fragmentului recoltat sunt în funcție de fixator. Grosimea fragmentului depinde de viteza de difuziune a lichidului fixator.

Astfel, în cazul utilizării amestecurilor osmice, grosimea va fi de 1—2 mm. In general, grosimea pieselor de fixat variază între 5—8 mm. Dacă grosimea piesei este potrivită, celelalte dimensiuni nu au importanță pentru fixare. Prelucrarea lor ulterioară depinde numai de calitățile omului de laborator și de posibilitățile lui de a lucra aceste piese. In orice caz, ca valoare histopatologică, piesele mari sunt cele care primează.

§ 191. — Practica fixării. Adesea, medicul care a recoltat o piesă pentru biopsie o trimite laboratorului de histopatologie, într'o compresă de tifon. Tifonul absoarbe lichidele țesutului recoltat și în câteva ore, dacă acesta nu e fixat, este uscat și retractat.

Mult mai rar piesa recoltată este trimisă în alcool sau în soluție salină fiziologică. Niciuna din aceste operații nu este însă mai fericită. Deaceea este recomandabil ca în sala de operație să existe și o cantitate de lichid fixator universal, eventual formol, în care operatorul să introducă piesa imediat după recoltare. Un alt obicei greșit este acela de a introduce piesa într'un recipient, cât mai mic posibil — ca să fie ușor de transportat — (eprubete, tuburi de catgut), turnându-se apoi deasupra câteva picături de alcool care întărește suprafața piesei. Piesa ajunge la laborator deformată de micul recipient în care a fost introdusă cu forța, uscată, sau parțial fixată. Orientarea ei în acest caz devine de multe ori imposibilă.

Din toate aceste inconveniente se pot trage următoarele concluzii:

a) Fragmentele de țesuturi trebue fixate într'un fixator bun, cât mai repede după recoltare.

b) Fixarea să se facă în recipiente suficient de mari ca să cuprindă nu numai piesa de fixat, dar și de 20—40 de ori volumul său de lichid fixator. Vasele cele mai bune au un fund lat, mai lat decât gâtul, pentru ca apa care iese din piesă să nu stagneze în vecinătatea sa imediată și să nu dilueze prin aceasta fixatorul. Pe fundul vasului se va pune un strat de vată de sticlă, hârtie de filtru sau se va pregăti un fir de ață cu ajutorul căruia va fi suspendată piesa, legând-o de dopul recipientului.

c) Să se introducă fixatorul în recipient în cantitate suficientă: considerăm că nu este superfluă repetiția, că volumul fixatorului trebue să reprezinte de 20—40 de ori cel al piesei de fixat. Numai în acest mod diluarea fixatorului de către apa țesutului va fi evitată, compoziția lui nu se va schimba prea mult, pH-ul va rămânea neinfluențat.

d) Piesa se va introduce în fixator, în așa fel încât să vină în contact cu fixatorul pe toată suprafața sa. Tot în acelaș recipient se introduce un cartonaș subțire pe care s'a scris *cu creion negru* numărul de înregistrare al piesei.

e) Recipientul va fi agitat apoi de câteva ori pentru a reînnoi stratul de lichid în contact cu piesa. Unii fixatori vor fi schimbați după câtva timp (vezi mai departe).

f) Pentru ca piesa să nu sufere deformări în cursul fixării, ea poate fi întărită în prealabil în formol, sau întinsă pe plută sau pe carton și fixată

cu ace de sticlă sau de arici sau cu ață subțire, până ce este întărită prin fixare. Se va alege suprafața secționării ulterioare, care nu trebue să vină în contact cu cartonul sau pluta.

§ 192. — **Oprirea fixării.** In momentul în care scopul urmărit prin fixare a fost atins, aceasta trebue întreruptă. Aceasta se face prin eliminarea fixatorului în exces și prin spălarea piesei fixate într'un curent de apă sau în alcool în exces, după caz.

§ 193. — **Spălarea în apă** este obligatorie după fixările în bicromați, acid cromic și tetraoxid de osmiu. Piesele fixate sunt puse într'un recipient perforat, închis cu un dop mare de plută care menține recipientul la suprafața apei din vas, sau într'un vas acoperit cu tifon, peste care curge apa, sau sunt legate într'un tifon cu numărul respectiv scris cu creionul negru pe carton și totul introdus într'un vas mare cu apă, care poate fi schimbată de câteva ori în 24 de ore. Fixatorul având o densitate mare se lasă la fund, așa încât antrenarea continuă cu apă nu este strict obligatorie.

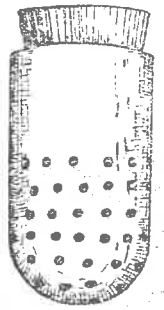


Fig. 1. — Vas găurit cu dop de plută pentru spălat piese în apă curgătoare după fixare.

§ 194. — **Spălarea în alcool.** După fixările în lichidele necromate și neosmiate, cu excepția fixării în formol, spălarea în apă este inutilă sau chiar dăunătoare. Piesele se pot trece direct în flaconul cu alcool diluat al bateriei de deshidratare, când sunt mici. Dacă fragmentul fixat este ceva mai mare pentru a nu disolva prea mult sublimat sau acid picric în alcoolul bateriei, este preferabil ca spălarea în alcool să se facă într'un vas separat. Practic, aceasta înseamnă mărirea bateriei pentru asemenea fixări cu 1—2 recipiente cu alcool 70—80% în care să fie spălate piesele.

SUBSTANȚELE FIXATOARE

§ 195. — Intre *substanțele fixatoare* vom trece pe acelea care singure sau amestecate cu altele îndeplinesc toate condițiile unui lichid fixator. In general, substanțele fixatoare — cu excepția câtorva — se întrebuințează rareori singure. Amestecul fixator prezintă de cele mai multe ori calitățile cumulate ale componenților. Utilizarea lor se face în funcție de aceste calități.

§ 196. — **Acetona** este utilizată mai ales în amestecuri. Acetona singură anhidră ratatinează țesuturile; este folosită pentru cercetări de finețe. Este un fixator rapid: secțiuni mici de 1—3 mm grosime se fixează în acetonă anhidră în 60—180 de minute, sunt trecute apoi 30 de minute într'un amestec de acetonă și benzen în părți egale și apoi prin benzen în parafină (acetona nu disolvă parafina).

§ 197. — **Acetatul de uranil,** ca și celelalte săruri de uran (sulfat, nitrat), este un fixator extrem de util în soluții *foarte diluate*, având o mare putere de difuziune în țesuturi. Sărurile de uran au însă defectul de a nu întări suficient piesele, deaceea ele sunt utilizate numai în amestecuri, cărora le măresc puterea de difuziune.

§ 198. — **Acidul acetic** folosit singur ca fixator dă rezultate foarte slabe. Este însă foarte frecvent utilizat în amestecuri fixatoare. Formele de acid acetic curente sunt cel glacial (100%), cel concentrat (96% cu 4% apă) și cel diluat (1%). Acidul acetic diluat determină apariția unor structuri nete în nuclei, în timp ce citoplasmele sunt parțial lizate.

§ 199. — **Acidul azotic** nu este de recomandat ca substanță fixatoare (se utilizează rar o soluție 2% din acid azotic d = 1,40, apoi spălare în alcool 70% — nu în apă). Acidul azotic alterează structurile citoplasmice și nucleare, topind mare parte din ele. Este folosit numai ca un component al fixării în unele metode de evidențiere a neurofibrilelor, în care este necesară topirea prealabilă a citoplasmelor (Bethe). Acidul azotic intră în compoziția câtorva amestecuri fixatoare.

§ 200. **Acidul cromic** este folosit singur din ce în ce mai rar, din cauza slabei sale viteze de pătrundere în țesuturi (1 mm în 4 ore). După fixare cu acid cromic, citoplasma apare vacuolizată, în timp ce nucleul își păstrează structura (la o concentrație 0,3—1% acid cromic). Acțiunea fixatoare a acidului cromic se datorește formării combinațiilor greu solubile cu proteinele și mucusul. Aceasta este de altfel principala cauză a slabei sale difuzibilități în țesuturi. In amestecuri, acțiunea sa fixatoare este întrucâtva superioară.

§ 201. — **Acidul fosfowolframic** (fosfotungstic), datorită puternicei sale acțiuni precipitante asupra proteinelor, este utilizat ca substanță fixatoare, mai ales în soluție alcoolo-acetică.

§ 202. — **Acidul picric** găsește o folosire largă în procesul de fixare, mai ales în amestec cu formolul, acidul acetic, azotic, cu sublimatul și mult mai rar singur. Afinitatea țesuturilor pentru coloranți nu se modifică după fixarea în acid picric. Acidul picric are și o ușoară acțiune decalcificantă (deci trebue manipulat cu atenție în cazul fragmentelor cu calcificări).

§ 202 a. — Acidul picric este utilizat de obicei sub forma soluției apoase saturate. Aceasta se păstrează indefinit. Soluția apoasă saturată se prepară turnând într'un flacon de 1—2 litri apă distilată fierbinte peste 30—50 g acid picric; se agită și se lasă să se răcească. La 100° se disolvă circa 1,2 g la 100 cc H_2O. In alcool, acidul picric se disolvă mult mai bine, iar în acetonă și cloroform concentrația la saturație depășește 10%. Din aceste motive, după fixarea cu acid picric, spălarea pieselor nu se face în apă, ci în alcool de 70—80%. (Introducerea pieselor în apă după fixările cu acid picric determină imbibiția țesutului conjunctiv). O spălare complectă de acid picric nu este necesară decât înainte de includerea în celoidină. In acest caz, piesele fixate în amestecuri picricate

trebue trecute din alcool în amestecul: ulei de cedru 10 cc, alcool absolut 80 cc, ulei de origan 20 cc, acid azotic 10 cc pentru 10—48 de ore, după care sunt trecute din nou în alcool de 96%. In condițiile obișnuite ale includerii în parafină, după deparafinarea secțiunilor, resturile de acid picric trebue îndepărtate pentru a se facilita colorarea nucleilor, care este dificilă în mediu acid. In acest scop, secțiunile sunt ținute 10—30 de minute într'un amestec în părți egale de alcool și soluție saturată de carbonat de litiu.

Utilizat singur, de obicei tot în soluție saturată, acidul picric difuzează greu în țesuturi (o soluție 0,75% traversează în 12 ore abia 1—2 mm) și ratatinează citoplasmele.

§ 203. — **Acidul platinclorhidric** este utilizat ca fixator pentru figurile mitotice. Difuzează extrem de greu în țesuturi (soluția 1:300 traversează 1 mm de țesut abia în 24 de ore). Rezultate mai bune dau amestecurile cu sublimat sau acid cromic.

§ 204. — **Acidul sulfosalicilic** este utilizat de unii histologi pentru marea sa acțiune precipitantă asupra proteinelor care devin insolubile. Difuzează relativ ușor; fragmentele fixate sunt consistente. Determină retracții ale unor țesuturi (sistemul nervos periferic), fixează însă bine miofibrile, glande, celule secretorii diferențiate. Afinitatea tinctorială este favorizată după fixarea cu acid sulfosalicilic.

Se utilizează în soluție apoasă 5% sau alcoolo-acetică (alcool absolut 100 cc, acid sulfosalicilic 3 g, acid acetic 5 cc) preparată extemporaneu. Acest amestec fixează piese de 2—3 mm grosime în 3 ore. Piesele se trec apoi direct în alcool absolut.

§ 205. — **Acidul tricloracetic** este utilizat singur în soluții apoase 5—10%. Durata de fixare este de 30—60 de minute pentru fragmente de 1 mm grosime, de 4 ore pentru piese de 6 mm grosime. Piesele se trec apoi direct în alcool de 96%, care este schimbat de câteva ori pentru îndepărtarea acidului. Alcoolurile mai diluate și apa nu sunt de recomandat, fiindcă produc umflarea țesutului conjunctiv prin imbibiție. Acidul tricloracetic difuzează repede și fixează bine. El are deasemenea o puternică acțiune decalcificantă.

Este utilizat pentru fixarea mușchiului striat și intră în compoziția unor amestecuri fixatoare de mare valoare.

§ 206. — **Alcoolul etilic** își bazează acțiunea sa fixatoare pe deshidratarea țesuturilor; chimic, el este practic indiferent față de acestea. Astfel, fixarea în alcool nu alterează componente pe care alți fixatori le distrug sau le extrag (mucină, glicogen, uree, fier, calciu). Alcoolul extrage însă grăsimile neutre și lipoizii, sterolii, substanța cromafină. Din aceste motive, unele organite celulare (plastozomii, aparatul reticular) nu se păstrează în piesele fixate în alcool. Citoplasmele sunt ratatinate.

§ 207. — Pentru fixare se utilizează mai ales alcoolul anhidru, *alcoolul absolut*. Fixări bune se obțin numai cu piese mai subțiri de 5 mm. Difuziunea alcoolului e rapidă (membranele sunt fixate în 15—30

de minute, grosimile de 1—2 mm sunt străbătute în 60 de minute, cele de 3—4 mm în 2—4 ore). Piesa nu trebue pusă pe fundul vasului, întrucât aici sedimentează alcoolul amestecat cu apă de extracție. Prelungirea fixării în alcool absolut nu este necesară și, mai mult, ea este chiar contraindicată, deoarece face piesele sfărâmicioase, ceeace se resimte în cursul secționării lor la microtom.

Din alcool piesele se trec direct în bateria de includere la parafină sau celoidină. Piesele fixate în alcool absolut pot fi deasemenea păstrate în terpineol sau în alcool de 80°.

Alcoolul este deseori un component important în unele amestecuri fixatoare.

§ 208. — **Alcoolul metilic** este utilizat ca fixator în hematologie, precum și în histopatologie ca fixator anhidru, singur sau în amestecuri.

§ 209. — **Bicromatul de potasiu** singur nu este de recomandat ca substanță fixatoare din cauza artefactelor pe care le produce (vacuole, aspecte reticulare, etc.). Bicromatul de potasiu este însă un component important al unei întregi serii de amestecuri fixatoare, în care acționează în special asupra citoplasmelor. După fixare în amestecuri cu bicromat de potasiu, fragmentele trebue spălate cu apă curgătoare 24—48 de ore pentru extracția unei cât mai mari cantități de bicromat. Alcoolul extrage din fragmentele fixate amestecuri cu bicromat grăsimile cromate. Deaceea, trecerea prin alcool trebue să fie rapidă, iar schimbarea acestuia în baterie, cât mai deasă, de îndată ce s'a îngălbenit.

§ 210. — **Cloroformul** este utilizat numai în amestecurile fixatoare. In general, în prezența sa, fixările sunt rapide grație difuzibilității în complexele lipidice ale citoplasmei, pe care le disolvă.

§ 211. — **Formolul** (formaldehida, formalina) este unul dintre fixatorii cei mai frecvent întrebuințați, mai ales la păstrarea pieselor mari. Formolul păstrează forma, culoarea și structura preparatelor, difuzează bine și dă puține precipitate. Fixarea în formol permite secționarea la microtomul de congelație. Păstrarea pieselor în formol timp prea îndelungat reduce însă mult varietatea colorațiilor posibile; în aceste cazuri se observă mai ales dispariția structurilor fine. Formolul este un fixator de valoare pentru studiul grăsimilor și lipoizilor, ca și al sistemului nervos (fosfatidele nu sunt însă fixate).

§ 212 — Nu sunt de recomandat fixările în formol în cazul studiilor de citologie. Structurile nucleare, sângele, glicogenul, fierul, guanina și ureea sunt alterate de acțiunea formolului.

§ 213 — Formolul reprezintă o soluție de 30—40% formaldehidă în apă. De regulă această soluție conține mici cantități de acid formic. Pentru histologie este necesar un formol neutru, lipsit de acizi. Formolul trebue păstrat în sticle de culoare închisă la temperatură mai mare de 9°. La temperaturi scăzute se produce o polimerizare a formal-

dehidei cu precipitarea *paraformaldehidei* (trioximetilen). Concentrația formaldehidei în soluție se stabilește titrimetric: 1 cc de soluție n/10 de iod corespunde la 0,001501 g formaldehidă. Neutralizarea formolului se face fără greutate cu carbonat de calciu care aduce pH-ul la 6,3—6,5. Diluarea acestui formol în apă de robinet, care este ușor alcalină, aduce pH-ul la 7,1. După neutralizare cu hidrat de sodiu sau cu carbonat de sodiu, diluția cu apă de robinet aduce pH-ul la 7,4—7,5.

§ 214. — Vaporii de formol au o acțiune nocivă asupra mucoasei căilor respiratorii și a ochilor. Formolul întărește pielea mâinilor și produce uneori eczeme uscate. Este recomandabil ca de fiecare dată mâinile să fie spălate cu apă alcalinizată cu amoniac.

§ 215. — Pentru fixare se utilizează diluții variabile (1/4—1/10 din soluția concentrată de formol). După mărimea piesei, fixarea durează 24—48—72 de ore. Este preferabil să se schimbe formolul a doua zi. In cazul păstrării piesei în formol, trebue folosită o soluție mai diluată decât cea utilizată pentru fixare.

După fixare, fragmentele se trec direct în alcool 90%. Numai în cazul secțiunilor la congelare pentru grăsimi, în cazul impregnațiilor argentice și al includerii la gelatină, fragmentele trebue spălate în apă curgătoare până la îndepărtarea formolului (24—48 de ore).

§ 216. — Unii cercetători utilizează formolul salin (1 p. formol concentrat + 8 p. soluție NaCl 0,8%). După fixare, spălarea se face în condițiile de mai sus. Formolul se mai folosește amestecat cu piridină, cu sulfați sau acetați. El face parte din numeroase amestecuri fixatoare.

§ 217. — Vaporii de formaldehidă sunt utilizați pentru fixarea infrastructurilor glandulare. Fixarea se face într'un fixator anexat la o trompă de apă. După aceea se întrerupe legătura și piesele rămân în vapori până la 24 de ore.

§ 218. — Pentru diagnostic rapid, fragmente mici sunt puse pentru câteva minute în formol care fierbe și apoi secționate la congelare.

§ 219. — Acțiunea fixatoare a formolului se datorește după cercetările recente unei metilenizări a proteinelor după deshidratare prealabilă. In cursul fixării se produce o umflare a țesuturilor, care este invers proporțională cu concentrația formolului (concentrațiile mari peste 1/4 sunt însă puternic ratatinante). După fixare țesuturile sunt acide, chiar dacă formolul a fost neutralizat în prealabil; cauza acestei acidificări este scoaterea din echilibru a funcțiilor aminice ale aminoacizilor, care au intrat în reacție cu formaldehida.

§ 220. — In preparatele care conțin cantități mari de sânge, fixate în formol, se produc deseori precipitate cristaline tipice de culoare brună, datorită acțiunii formaldehidei asupra hemoglobinei (precipitatele dau o reacție pozitivă cu benzidina). Indepărtarea acestor precipitate se face prin două metode:

a) secțiunile necolorate sunt puse pentru 5 minute — 4 ore într'o soluție 1—5% de amoniac în alcool 70%. Afinitatea tinctorială a țesuturilor nu este alterată, dar odată cu precipitatele este disolvat și pigmentul malaric care s'ar găsi în țesut. Ceilalți pigmenți (pigmentul brun de uzură, melanina, hemosiderina, cărbunele) nu sunt influențați;

b) secțiunile necolorate sunt puse pentru 10 minute într'un amestec făcut din una parte hidrat de potasiu 1% în apă și 100 părți alcool 80%, apoi de două ori câte 5 minute în apă, 5 minute în alcool 80% și, în fine, spălare în apă curgătoare.

§ 221. — Dacă piesele fixate timp îndelungat în formol s'au întărit prea mult, ele pot deveni mai moi ținându-le 10—14 zile într'o soluție de NO Ag 1% sau de acid citric 10%.

§ 222. — **Sublimatul** (clorura mercurică) este rar utilizat singur, ci mai ales în amestecuri fixatoare. Acțiunea sa se manifestă în special asupra citoplasmei, mai puțin asupra nucleului, producând retracții puternice. Sublimatul este un precipitant puternic al proteinelor. Lipoizii și grăsimile nu sunt fixate de sublimat. Afinitatea tinctorială a țesuturilor fixate în amestecuri cu sublimat este excelentă.

§ 223. — In cursul utilizării sublimatului nu se vor folosi instrumente de metal, pentrucă acestea produc precipitate: se vor folosi numai instrumente de sticlă, lemn sau corn.

§ 224. — Pentru prepararea unei soluții apoase saturate de sublimat se disolvă 60 g sublimat într'un litru de apă fierbinte, conținut într'un vas de 2 litri. Soluțiile în apă distilată se păstrează indefinit.

§ 225. — Fixarea se face în soluția saturată sau în cea semisaturată. Durata fixării este în general scurtă, difuzibilitatea sublimatului în țesuturi fiind destul de mare. Astfel, grosimi de 1 mm sunt pătrunse în 30—60 de minute, 3 mm în 3—4 ore. Piesele fixate capătă o culoare albă. După fixare piesele nu trebue spălate în apă, ci în alcool, sublimatul fiind mult mai solubil în alcool decât în apă.

§ 226. — După fixările în sublimat apar de obicei precipitate în țesuturi, formate din mercur metalic sau din clorură mercuroasă. Indepărtarea acestor precipitate se face cu o soluție de alcool iodat, alcool 70—80% cu câteva picături din soluția alcoolică de iod (iod 2 g, iodură de potasiu 3 g, alcool 90% 100 cc) sau cu soluția Lugol (iod 1 g, iodură de potasiu 2 g, apă 200 cc). Iodul disolvă precipitatele, formând o sare complexă cu mercurul (tetraiodomercuratul dipotasic). Disolvarea precipitatelor se poate face încă înainte de includere sau mult mai ușor, după deparafinarea secțiunilor. Acest timp este în orice caz necesar, chiar dacă piesele au fost iodate înainte de includere).

Indepătarea iodului se face prin imersia fragmentelor sau a secțiunilor pentru câteva minute într'o soluție diluată 0,25—1% de tiosulfat de sodiu în apă, preparată extemporaneu dintr'o soluție-mamă. Soluțiile mai concentrate decât 1% produc umflarea infrastructurilor celulare.

Țesuturile fixate în amestecuri fixatoare conținând sublimat trebue tratate și ele ca mai sus.

§ 227. — Tetraoxidul de osmiu (acidul osmic) este unul dintre cei mai buni fixatori celulari, este însă foarte scump. El nu produce precipitate. Acidul osmic produce uneori mărirea dimensiunilor miceliilor coloidale din citoplasmă.

Tetraoxidul de osmiu este cristalizat la temperaturi sub 15°. La temperatura camerei este lichefiat. Se utilizează de obicei soluții apoase 1—2%. Soluțiile nu sunt acide, ci ușor alcaline. Lumina nu reduce tetraoxidul de osmiu; grăsimile însă și, în genere, toate substanțele organice, îl reduc la osmiu metalic (deaceea flacoanele în care se fac soluțiile trebue bine curățite cu acizi).

Fixarea cu tetraoxid de osmiu oxidează diferitele structuri celulare, modificându-le în grade diferite afinitățile tinctoriale. După fixare, nucleii apar galbeni-murdar, citoplasma, fibrele musculare și elastice cenușii-brune; grăsimile neutre și lipoizii se colorează dela galben-brun până la negru.

Difuziunea tetraoxidului de osmiu în țesuturi este foarte lentă; deaceea numai suprafețele sunt bine fixate. Soluția 2% difuzează mai bine decât cele mai diluate: 1—2 mm sunt penetrați în 4 ore, iar 2—3 mm în 24 de ore.

Fixările cu tetraoxid de osmiu se fac în soluție apoasă sau în vapori.

Fragmente mici (1—2 mm) se țin 1—2 zile într'o soluție 1—2% în cantitate de cel puțin cinci ori mai mare. După fixare se spală la apă curgătoare.

§ 228. — Fragmentele foarte mici, membranele, frotiurile, pot fi fixate, cu tetraoxid de osmiu. Celulele sunt omorîte rapid și fixate. forma lor păstrându-se intactă (de exemplu, pseudopodele). Se pun într'o sticlă de ceasornic câteva picături de tetraoxid de osmiu 1—2%; fragmentele sau porțiunile sunt ținute deasupra vaporilor fără să vină în contact cu soluția. Frotiurile subțiri se fixează în 1—2 minute, cele groase și membranele în 1—3 ore. Suprafixarea alterează celulele.

§ 229. — Dacă nu se supracolorează preparatele fixate cu tetraoxid de osmiu, culoarea brună-neagră poate fi conservată (balsamul de Canada o alterează) prin trecerea preparatelor din apă în alcool de 70% în care s'a disolvat un cristal de sulfură de sodiu.

§ 230. — După fixare în tetraoxid de osmiu, colorațiile reușesc cu greutate. Cromizări ale pieselor permit colorații cu carmin; secțiunile la parafină pot fi colorate cu safranină.

§ 231. — Albirea zonelor în care tetraoxidul de osmiu a fost redus se poate face cu cu hipermanganat de potasiu și acid oxalic sau cu apă oxigenată. Totodată, secțiunile își recapătă afinitatea lor tinctorială.

§ 232. — Amestecurile fixatoare în compoziția cărora intră tetraoxidul de osmiu sunt de două tipuri: unele conțin acid acetic și favorizează studiul nucleilor, altele nu conțin acid acetic și sunt folosite pentru studiul citoplasmei, al mitocondriilor, aparatului reticular, etc.

AMESTECURILE FIXATOARE

§ 233. — Manualele de tehnică obișnuesc să grupeze lichidele fixatoare după compoziția lor (lichide picricate, osmiate, cromate, etc.). Acest criteriu de clasificare nu este însă prea potrivit pentru practică. El este valabil numai pentru cunoscători, care în această situație, practic nu au prea mare nevoie de o clasificare a fixatorilor. Pentru începători, însă, aceștia necunoscând acțiunea fiecărui component al amestecului fixator, gruparea amintită este ir operantă. Deaceea considerăm că gruparea amestecurilor fixatoare după indicațiile lor este mult mai justă. Vom folosi tocmai acest criteriu în prezentarea amestecurilor fixatoare, conformându-ne bineînțeles principiilor enunțate în introducere, de a da numai fixatorii cei mai utilizați.

FIXATORII UNIVERSALI

§ 234. — Picroformolul acetic (Bouin). Se prepară din 1 parte formol concentrat și 3 părți soluție apoasă saturată de acid picric. In momentul utilizării se adaugă acid acetic 5% sau tricloracetic 2%. Masson utilizează o variantă mai comodă: amestecă 1 parte formol cu 3 părți apă și 0,2 părți acid acetic; adaugă apoi acid picric în exces (peste 3%); agită din când în când. După două zile amestecul poate fi folosit. Se conservă nedefinit.

Indicații — cercetări topografice și citologie generală. Contraindicații — organe hematopoetice și oricare altele în care este necesară păstrarea eritrocitelor (acidul picric hemolizează). Mitocondriile sunt distruse. Includerea în celoidină nu este posibilă, acidul picric făcând celoidina sfărâmicioasă.

Intrebuințare — grosimea maximă a piesei: 5 mm; durata minimă a fixării 24 de ore, durata optimă 48—72 de ore (după mărimea piesei), durata maximă 8 zile. Fixarea în picroformol acetic favorizează toate colorațiile uzuale.

După fixare piesele se spală rapid în apă în cazul secționării la microtomul de congelare. Pentru includerea în parafină, piesele se trec în alcool.

§ 235. — După confecționarea secțiunilor și deparafinarea lor, acidul picric trebue eliminat pentru a favoriza colorarea nucleilor. In acest scop se folosește un amestec în părți egale de alcool 90% și soluție apoasă saturată de carbonat de litiu.

§ 236. — **Lichidul Dubosq-Brazil** este o variantă curent utilizată, în care alcoolul complectează acțiunea celorlalți fixatori. Prepararea sa este următoarea: se disolvă 1 g de acid picric în 150 cc alcool 80%; înainte de fixare se adaugă, la această cantitate, 60 cc formol concentrat și 15 cc acid acetic glacial. Indicații și contraindicații ca mai sus. Durata fixării, idem. După fixare se trece direct în alcool 90%. Favorizează colorațiile pentru incluzii uratice.

§ 237. — **Lichidul Bouin-Hollande** este o altă variantă a amestecului picroformol acetic. Se prepară astfel: într'un mojar sunt disolvate încet, frecând continuu 2,5 g acetat neutru de cupru în 100 cc H_2O. După disolvare se adaugă în acelaș mod 4 g acid picric. Se fiiltrează. La filtrat se adaugă 10 cc de formol concentrat și 1 cc acid acetic glacial. Se conservă nedefinit. Indicații: fixează bine peptonele și lipoizii. Contraindicații — ca mai sus. Durata fixării: 3 zile; după fixare, spălare 24 de ore în trei ape, apoi în alcool; colorații ca mai sus.

§ 238. — **Susa** (sublimat + sare, Heidenhain). Amestecul se prepară din sublimat 4,5 g, clorură de sodiu 0,5 g, apă 80 cc, acid tricloracetic 2 g, acid acetic 4 g, formol 20 cc. Este unul din cei mai buni fixatori universali; fixează bine citoplasmele și nucleii, mucusul, glicogenul.

Pătrunde extrem de repede țesuturile, chiar pe cele bogate în țesut conjunctiv. Prin fixare piesele se albesc, în urma formării precipitatelor proteice albe. Grosimea pieselor 3—8 mm. Durata fixării 1—24 de ore, după mărimea piesei. Durata optimă 1—6 ore. Piesele fixate se trec apoi în alcool 90%, care se schimbă de câteva ori. După confecționarea secțiunilor la parafină, resturile de sublimat se scot cu o soluție de iod, iar acesta cu tiosulfat de sodiu. Fixarea pieselor în Susa permite toate colorațiile uzuale, inclusiv metoda cu carmin după Best pentru glicogen. Poate fi folosit și la fixarea pieselor colorate vital cu albastru tripan.

Ca variante ale amestecului Susa se utilizează frecvent următoarele trei amestecuri:

§ 239. — **Subtri** (sublimat + tricloracetic, Heidenhain) compus din 100 cc soluție apoasă saturată de sublimat, 2 g acid tricloracetic, 1 cc acid acetic glacial. Aceleași indicații ca la Susa.

§ 240. — **Lichidul A. M. Vasiutocichin** compus din 50 cc soluție apoasă de sublimat și 50 cc soluție apoasă saturată de acid picric. La acest amestec se adaugă în momentul întrebuințării 10 cc formol concentrat și 5 cc acid acetic glacial. Indicații generale ca la picroformol acetic și Susa. Deasemenea fixează bine materialul provenit dela amfibii.

§ 241. — **Lichidul Romeis** se compune din 25 cc soluție apoasă saturată de sublimat, 20 cc acid tricloracetic, 5 cc formol. Piesele după mărime sunt fixate în 1—24 de ore, apoi se trec în alcool 80—90%. Aceleași indicații ca mai sus. Fixează bine țesuturile bogate în apă, de exemplu, larvele de batracieni.

§ 242. — **Lichidul Zenker** este unul dintre bunii fixatori universali, întrebuințat cu predilecție în fixarea parenchimelor glandulare. El se compune din bicromat de potasiu 2,5 g, apă 100 cc, sublimat 5 g, sulfat de sodiu 1 g. La întrebuințare se adaugă 5% acid acetic glacial.

Indicații: cercetări histologice generale, parenchime glandulare. După grosime, piesele se fixează în Zenker între 6—48 de ore. Apoi spălare 24—48 de ore în apă curgătoare pentru eliminarea bicromatului. Sublimatul se elimină în cursul deshidratării și apoi prin tratarea secțiunilor cu soluție iodo-iodurată și tiosulfat de sodiu. Includere în celoidină, celoidin-parafină și parafină. Pătrunde rapid țesuturile. Favorizează toate colorațiile. O fixare prelungită alterează nucleii, dar evidențiază unele organite citoplasmatice.

Ca derivați ai acestui amestec fixator se utilizează curent:

§ 243. — **Lichidul Helly**, în care acidul acetic ce se adaugă în momentul fixării este înlocuit prin aceeași proporție de formol concentrat. Fixare 1—6 ore. Indicații speciale — organe hematopoetice și mitocondrii (prelungirea fixării peste 24 de ore și tratare apoi cu bicromat de potasiu 3% 1—2 zile).

§ 244. — **Lichidul Maximov** este deasemenea un fixator universal de compoziție asemănătoare, utilizat cu precădere în fixarea organelor hematopoetice, a căror structură o păstrează mai bine decât fixatorii anteriori. Compoziția sa este următoarea: bicromat de potasiu 2,5 g, sulfat de sodiu 1 g, sublimat 5 g, apă 100 cc, formol 10 cc, acid osmic 2% 10 cc. Fixarea durează, după mărimea piesei, 1—48 de ore. Secțiunile prind orice colorație; grăsimile se colorează în negru prin reducerea acidului osmic.

§ 245. — **Lichidul Nichiforov**, cu indicații universale, are următoarea compoziție: bicromat de potasiu 5% 50 cc, soluție apoasă saturată de sublimat în soluție clorurată 0,9% 50 cc, acid osmic 2% 7—10 cc, acid acetic glacial 3—5 pic. Aceleași indicații ca la lichidul Maximov.

FIXATORII NUCLEARI

§ 246. — Dintre fixatorii universali pot fi folosiți cu succes pentru studiul nucleului numai picroformolul acetic și derivatele sale (§ 234, 236, 237). Ca fixatori nucleari speciali se utilizează:

§ 247. — **Lichidul Allen** (B_5) este un derivat al picroformolului acetic. Se prepară astfel: se amestecă 75 cc soluție apoasă saturată de acid picric, 25 cc formol concentrat și 5 cc acid acetic; se încălzește la 38° într'un vas închis și se disolvă la această temperatură, prin agitare, 1,5 g acid cromic cristalizat și, după disolvarea acestuia, 2 g uree cristalizată. Se prepară numai în momentul întrebuințării. Soluția are o culoare brună-închis, dar e limpede. Se fixează fragmente de 4—5 mm la 37—38°, cel mult 2 ore.

Fixarea se întrerupe trecându-se piesele în alcool 70% sau se continuă în picroformol acetic. Colorațiile ulterioare sunt cele uzuale. Este unul dintre cei mai buni coloranți nucleari, în special pentru mitoze.

§ 248. — **Lichidul Carnoy** se compune din 60 cc alcool absolut, 30 cc cloroform și 10 cc acid acetic glacial. Pătrunde extrem de rapid: în patru ore ajunge la o adâncime de 3 cm. Această viteză de difuziune are la bază acțiunea acidului acetic disociat ionic care alterează starea coloidală a țesuturilor și acțiunea cloroformului asupra lipidelor și lipoidelor. Aceste două momente favorizează pătrunderea alcoolului.

Fixarea curentă durează 1—3 ore; dacă se prelungește fixarea, piesele se întăresc prea mult și apar artefacte. După fixare, piesele se trec în alcool absolut. Toate colorațiile curente sunt posibile după această fixare.

§ 249. — **Amestecul cromoacetoosmic** (Flemming) se utilizează de obicei în următoarea compoziție: 15 cc acid cromic 1%, 4 cc acid osmic 2% 1 cc acid acetic glacial (amestecul se face extemporaneu). Pentru a evita alterarea acidului osmic se recomandă următorul procedeu: se disolvă 0,5 g tetraoxid de osmiu în 118,7 cc acid cromic 1%. La întrebuințare se adaugă 1 cc acid acetic la 19 cc amestec.

Din cauza slabei difuzibilități în țesuturi a acidului osmic, se fixează în acest amestec piese nu mai mari de 3 mm, fără sânge pe suprafață (coagularea acestuia împiedică pătrunderea amestecului). In acest scop, fragmentele se usucă bine cu hârtie de filtru. Fixarea durează 24—72 de ore, apoi piesele se spală 24 de ore. Includere prin alcool în parafină, colorare cu hematoxilină ferică, safranină, etc.

In general, trebue utilizate numai secțiunile provenite din zonele învecinate cu suprafața. Aceasta este totdeauna suprafixată, în timp ce în centrul fragmentului nu a ajuns decât acidul acetic.

§ 250. — **Lichidul Tellyesniczky** este un bun fixator nuclear, care alterează citoplasmele, pătrunde rapid țesuturile (1 mm pe oră), inclusiv conjuctivul.

Se prepară prin adăugarea în momentul întrebuințării a 5 cc acid acetic glacial la 100 cc bicromat de potasiu 3%. Fixarea durează 1—2 zile, se spală 24 de ore în apă curgătoare, apoi deshidratarea se face într'o serie de alcooluri de concentrație crescândă, care începe dela 15%.

Fixarea are la bază acțiunea acidului acetic care, pătrunzând rapid, precipită nucleoproteinele înaintea albuminelor plasmatice, ce sunt precipitate mai încet de bicromatul de potasiu.

FIXATORII CITOPLASMATICI

§ 251. — Ori de câte ori nu se urmărește fixarea unui organit citoplasmatic special (mitocondrii, aparat Golgi, structuri fibrilare, etc.), cea mai mare parte a fixatorilor universali pot fi utilizați cu deplin succes.

Sunt de recomandat în special picroformolul acetic și derivatele sale, Susa, lichidele Zenker, Helly și Maximov, amestecul cromoacetoosmic.

In ceeace privește organitele speciale (mitocondrii, aparat Golgi, structurile fibrilare), se recomandă fixatorii adecvați.

a) Condriomul

§ 252. — Fixarea mitocondriilor se face din materialul viu, de predilecție cu amestecuri cromate sau osmice, iar fixarea durează, chiar când piesa e mică, cel puțin 24 de ore. Fixatorii curent utilizați sunt:

§ 253. — **Lichidul Champy** compus din 7 cc bicromat de potasiu 3%, 7 cc acid cromic 1%, 4 cc acid osmic 2%. Durata fixării 24—48 de ore, apoi cromarea pieselor în bicromat de potasiu 2—3 % timp de 3—8 zile, după care se spală 24 de ore în apă curgătoare. Includere în parafină.

§ 254. — **Lichidul Roschin** se compune din 10 cc acid osmic 2%, 5 cc bicromat de potasiu 2,5%. Inainte de întrebuințare se adaugă 1 picătură acid tricloracetic 5%. Fragmentele de țesut viu se fixează 24 de ore, apoi se spală la robinet 24 de ore.

§ 255. — **Lichidul Regaud** este fixatorul cel mai utilizat. Fixarea fragmentelor de țesut viu se face într'un amestec de 80 cc bicromat de potasiu 3% și formol concentrat neutralizat 20 cc, timp de patru zile, schimbând zilnic lichidul. Apoi piesele se cromează 8 zile, după care se spală 24 de ore în apă curgătoare. Includere în parafină.

§ 256. — **Lichidul Podvâsoțchi** este un amestec de 100 cc soluție apoasă de sublimat 0,5%, 15 cc acid cromic 1%, 4 cc acid osmic 2% și 6—8 picături de acid acetic.

§ 257. — **Lichidul Ceasovnicov** ete un amestec de 30 cc soluție clorurată 0,9% saturată cu sublimat și 10 cc acid osmic 2%, la care se adaugă 3—5 picături de acid acetic înainte de întrebuințare.

Acești doi ultimi fixatori nu necesită supracolorări, întrucât țesuturile rămân după fixare colorate în brun-închis.

§ 258. — **Amestecul Țupa** permite fixarea condriomului în celula nervoasă adăugând la 100 cc lichid Regaud 1 g nitrat de uraniu. Fixarea durează 24—48 de ore, apoi spălare în apă.

b) Aparatul Golgi

§ 259. — Pentru punerea în evidență în celule a aparatului reticular al lui Golgi, fixarea specială este o necesitate. Aceasta se poate face fie în lichidul lui Champy (253), fie în următorul amestec, care impregnează în acelaș timp aparatul reticular.

§ 260. — **Fixarea după Aoyama** se face în amestecul: 15 cc formol neutralizat, 85 cc H_2O, 1 g clorură de cadmiu, timp de 3—4 ore. Se spală piesele rapid în două ape distilate, după care sunt introduse pe

10—15 ore într'o soluție 1,5% de nitrat de argint, la temperatura camarei. Se spală repede în două ape, după care se face reducerea 5—10' în hidrochinonă 1—2 g, formol neutralizat 15 cc, apă 100 cc, sulfură de sodiu 0,1 —0,5 g (prepararea extemporanee). Spălare abundentă în apă curgătoare, includere în parafină.

c) Structurile fibrilare

§ 261. — Evidente în mușchii netezi sau striați, în epitelii, etc., ele se pun în evidență după fixări speciale în acid tricloracetic 5%, în Susa (§ 238) și Subtri (§ 240), ca și în amestecurile de mai jos.

§ 262. — **Sublimatul acetic** (Larg) se compune din 100 cc soluție apoasă saturată de sublimat și 5—10 cc acid acetic glacial. Fixarea durează 1—6 ore (dacă piesele sunt mai mari, fixarea trebue continuată în soluție saturată de sublimat până la 24 de ore). Apoi spălare în alcool 70%.

§ 263. — **Alcoolul formolat** (Schaffer) este un amestec de două părți alcool (dela 80% până la alcool absolut) și o parte formol comercial. El fixează țesuturile în 1—2 zile sau mai mult pentru piesele mai mari. Piesele se trec apoi în alcool 96%. Pentru embrioni și telolecite este preferabilă folosirea alcoolului 80%.

FIXĂRI SPECIALE

§ 264. — In afara fixatorilor enumerați mai sus se folosesc amestecuri fixatoare care au indicații speciale.

§ 265. — **Fixarea grăsimilor** se face în formol, în lichidul lui Maximov (§ 244) în amestecul cromoacetoosmic (§ 249), în amestecurile pentru condriom care conțin acid osmic, precum și în:

§ 266. — **Fixatorul Ciaccio** compus din 80 cc bicromat de potasiu 5%, 20 cc formol 40%, acid formic 4—5 picături (sau acid acetic glacial 5 cc). Fixarea durează două zile, după care se face cromarea pieselor în bicromat de potasiu 3%. Durata cromării variază; astfel, pentru fosfatidele nesaturate (ovolecititină, cefalină, mielină, cuorină) sunt suficiente 1—2 zile pentru a le insolubiliza. Pentru amestecurile de fosfatide nesaturate, colesterol și esteri de colesterol, sunt necesare 2—4 zile de cromare, iar pentru fosfatidele saturate, 5 zile. In acest mod, fixarea în amestecul Ciaccio permite și o diferențiere histochimică a diferitelor grăsimi.

După cromare, piesele se spală 24 de ore în apă curgătoare, sunt trecute 24 de ore printr'o serie din ce în ce mai concentrată de alcooluri, unul la două ore în alcool absolut și se includ în parafină după ce au suferit o trecere intermediară prin sulfură de carbon sau benzen.

§ 267. — **Fixarea glicogenului** se face în alcool absolut, în Susa, în amestecul Carnoy (§ 248) precum și în fixatorii anhidrii (§ 275).

§ 268. — **Sângele și organele hematopoetice** se fixează de predilecție în amestecurile: Helly (§ 243), Maximov (§ 244), Schaffer (§ 263), Tellyesnicsky (§ 250).

§ 269. — **Organele auditive interne**, atunci când nu se pot fixa prin injectare, se fixează mai ales în amestecul făcut extemporaneu din: 85 părți bicromat de potasiu 5%, 10 părți formol concentrat, 5 părți acid acetic glacial și 100 părți H_2O. Fixarea durează o zi la termostat sau două zile la temperatura camerei. Piesele sunt puse apoi într'o soluție 5% de sulfat de litiu și spălate 24 de ore la robinet. Deshidratare și includere în celoidină. Decalcificarea cu acid azotic se face numai după încluderea în celoidină pentru a evita modificări de structuri (Wittmaack).

§ 270. — **Embrionii** se fixează în formol și în:

§ 271. — **Amestecul de sublimat cu clorură de platină** (Rabl); se prepară extemporaneu din 10 cc soluție de clorură de platină 1%, 10 cc soluție apoasă saturată de sublimat, 20 cc H_2O. Fixarea se face timp de 24 de ore în cantități mari de fixator. Apoi spălare în apă. Deshidratare rapidă în alcooluri concentrate.

§ 272. — **Amestecul Petrunchievici** este format din 30 cc H_2O, 20 cc alcool absolut, acid acetic glacial 9 cc, acid azotic 1 cc, sublimat până la saturație (cca 2 g). Fixare după mărimea piesei, 1—6 ore, apoi trecere în alcool 70%.

§ 273. — **Substanța nervoasă** se fixează mai ales în formol, dar și într'o serie de amestecuri speciale, după scopul urmărit (vezi capitolul respectiv).

* * *

§ 274. — In ultimul timp se utilizează din ce în ce mai mult amestecuri fixatoare în care apa intră în cantități foarte mici sau lipsește complect (fixatori anhidri). In acest mod se scurtează foarte mult timpul, spălările nemaifiind necesare, deshidratarea începând încă în cursul fixării.

Iată câteva amestecuri mai utilizate.

§ 275. — **Amestecul picrodioxanic** conține 5 părți soluție apoasă saturată de acid picric, 1 parte acid acetic glacial și 4 părți dioxan. Fixarea durează, după mărimea piesei, 1—3 ore, apoi fragmentele fixate se trec direct în dioxan, dioxan-parafină și parafină.

§ 276. — **Amestecul dioxanmetilic** se compune din 80 cc dioxan, 20 cc alcool metilic, 2 g paraldehidă (aldehidă formică trimerizată), 5 cc acid acetic glacial. Fixarea durează, după mărimea piesei, 1—24 de ore, apoi fragmentele se trec direct în dioxan, dioxan-parafină, parafină.

§ 277. — **Amestecul dioxancupric** este o modificare a lichidului lui Petrunchievici; el conține 100 cc dioxan 60%, azotat de cupru cristalizat 2 g, acid azotic (d = 1,41) 3 cc, paranitrofenol cristalizat 5 g. Se agită

48 de ore, după care se adaugă 5 cc eter. In acest moment fixatorul este bun de întrebuinţare. Piesele mici, de 2—4 mm, sunt fixate în 4—6 ore, cele mari în 24—48 de ore. După fixare, piesele se trec direct în dioxan.

§ 278. — Aceste amestecuri sunt fixatori universali. Ca un fixator special se utilizează:

§ 279. — Amestecul format dintr'o soluţie saturată de acid picric în dioxan 8,5 părţi, formol 1 parte, acid acetic 0,5 părţi (acidul picric se disolvă până la 35% în dioxan). Durata fixării 1 oră, apoi trecere în dioxan şi parafină. Indicat pentru *glicogen*.

§ 280. — Tot ca fixator indicat pentru glicogen, dar şi cu valoare de fixator universal, este următorul *amestec*, format prin disolvarea a 10 g acid picric în 50 cc acetonă şi 50 cc cloroform. Fixarea pieselor mici (3—4 mm) durează 1 oră, a celor mai mari 2—4 ore. Din fixator piesele se trec în cloroform pentru 30—60 de minute, cloroform + parafină şi parafină. Permite orice colorație.

CONGELAREA ŞI SECŢIONAREA LA GHIAŢĂ

§ 281. — Metoda secţionării pieselor congelate trebue folosită în următoarele împrejurări: 1) când piesele în studiu nu suportă acţiunea reactivilor folosiţi pentru metodele de includere; 2) când urmărim să punem în evidenţă anumiţi componenţi ai ţesuturilor, cum sunt grăsimile şi lipoizii, care ar fi solubilizaţi de reactivii (ca xilenul, benzenul, cloroformul, etc.) utilizaţi pentru metodele de includere; 3) pentru executarea unor tehnici de colorare sau impregnare speciale; 4) metoda este des folosită în situaţiile când este necesar un diagnostic urgent (în 15—30′ se poate da diagnosticul).

§ 282. — Piesele provenite din ţesuturi dure nu se pretează secţionării la ghiaţă, întrucât devin atât de tari încât se sfărâmă în momentul secţionării.

§ 283. — Piesele care urmează să fie congelate şi apoi secţionate nu trebue fixate în amestecuri cu sublimat sau bicromat. In general, mulţi fixatori permit tăierea la ghiaţă a pieselor, dar cel mai bun este formolul. Piesele fixate în formol trebue bine spălate înainte de secţionare, fiind altfel foarte sfărâmicioase. După spălare, înainte de secţionare, piesele trebue pregătite, în sensul că se va căuta, pe cât posibil, să nu fie mai groase de 1—1,5 cm, să aibă suprafeţele paralele şi să fie orientate în aşa fel încât să nu fie secţionată dela primele cupe, care uneori nu reuşesc, tocmai partea interesantă.

§ 284. — In general este recomandabil ca din piesa de lucrat prin metoda congelării să se păstreze un fragment care să fie prelucrat cu una din metodele obişnuite de includere.

§ 285. — Secţiunile obţinute prin secţionarea pieselor congelate pot fi supuse unei serii de colorații, în funcţie de scopul urmărit. Astfel,

pentru un diagnostic rapid se execută obişnuit colorația cu hemalaun-eozină; pentru punerea în evidenţă a grăsimilor şi lipoizilor, colorațiile cu sudan III, scharlach, albastru de Nil, etc. Secţiunile pot fi supuse şi unor tehnici speciale pentru sistemul nervos (Benda-Spielmayer, Bielschowsky-Gros, etc.).

§ 286. — Congelarea pieselor este obţinută fie prin evaporarea rapidă a unor corpi volatili cum ar fi eterul, clorura de etil, fie prin retransformarea în gaz a unui gaz lichefiat, ca de exemplu bioxidul de carbon. Metoda cu bioxid de carbon este de altfel metoda folosită în mod curent. Ambele metode se bazează pe absorbţia masivă de căldură în momentul trecerii în stare de vapori.

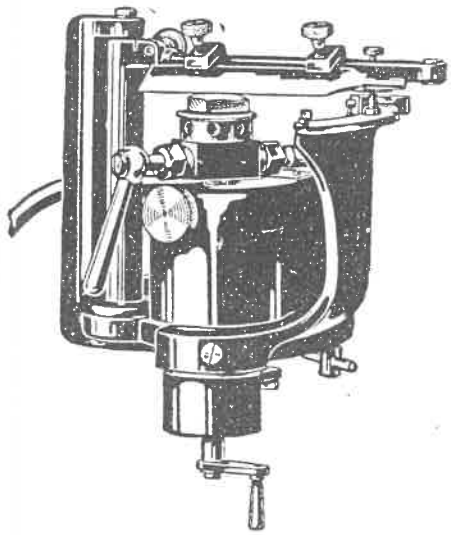


Fig. 2. — Microtom de congelare.

§ 287. — Curent, îngheţarea pieselor, ca şi secţionarea lor, se realizează cu ajutorul microtomului cu ghiaţă, care foloseşte bioxid de carbon.

§ 288. — Principiul după care funcţionează microtomul de congelare este următorul: piesa este aşezată pe un suport cavitar în care se face detenta bioxidului de carbon, ce vine dela o bombă cu bioxid de carbon lichid. Suportul se răceşte odată cu piesa. Suportul este montat pe scheletul metalic al microtomului şi poate fi ridicat sau coborît cu ajutorul unei manivele. Cuţitul se fixează prin două clame de suportul său. Acesta este mobil în jurul unui ax şi poate fi mişcat în arc de cerc prin intermediul unui mâner care îl prelungeşte. Prin mişcarea acestui dispozitiv, suportul piesei se ridică. Ridicarea acestuia poate fi reglată cu ajutorul unui indicator, mobil, care arată în microni grosimea secţiunilor. Cuţitul este deasemenea răcit prin vaporizarea bioxidului de carbon lichid, la nivelul unui orificiu aşezat sub cuţit. Intreg aparatul se fixează printr'un mecanism simplu, pe colţul unei mese. Microtomul este în legătură, printr'un tub perfect închis, cu o bombă de bioxid de carbon. Bomba va fi aşezată fie culcat, fie cu robinetul în jos pe un trepied special. In felul acesta favorizăm ieşirea gazului. Nu o vom aşeza deci niciodată cu robinetul în sus.

§ 289. — Cuțitele pentru microtomul cu ghiață carbonică sunt mici, cu două fețe plane, sau una plană și alta curbă. Spre piesă va fi așezată totdeauna fața plană. Despre cuțite vezi cap. respectiv.

§ 290. — **Tehnica secționării la congelare.** 1) Pe suport se aranjează o rondelă de hârtie de filtru udă. 2) Piesa se așează peste această rondelă. 3) Se deschide robinetul bombei de bioxid de carbon. 4) Apoi se deschide pentru câteva secunde robinetul care permite ieșirea gazului prin canalele din suport. In acest fel suportul se răcește puternic și piesa este fixată de suport. Controlăm acest fapt. 5) Acoperim apoi cu un cristalizor mic sau cu un capac metalic atât piesa, cât și suportul său, și dăm drumul, dela același robinet, unui jet puternic de gaz, timp de 20—30". Ridicăm capacul (sau cristalizorul) și controlăm dacă piesa s'a răcit (dacă nu, repetăm operația). Piesa nu trebue să fie răcită prea mult, pentrucă devine sfărâmicioasă. Momentul optim de răcire îl sezisăm prin exercițiu. 6) Dacă piesa s'a răcit, potrivim cuțitul, mișcându-l cu mâner cu tot, deasupra orificiului prin care vine gazul, și deschidem robinetul respectiv. Un jet puternic de gaz de 5—10" este suficient ca să răcească cuțitul. 7) Potrivim piesa, ridicând suportul, astfel încât, mișcând cuțitul, acesta să alunece pe suprafața piesei. Este recomandabil să nu ridicăm piesa atât de sus încât dela prima mișcare cuțitul să taie din ea, ca să nu se piardă o parte importantă din piesă. 8) Pentru a executa secționarea piesei, mișcăm cuțitul (prins de suportul respectiv) în jurul axului acestuia într'o parte și în alta, atât cât permite aparatul. Mișcările nu vor fi prea puternice; ele vor fi însă repezi la început; reglatorul care arată grosimea secțiunilor (și deci numărul de microni cu care se ridică suportul) va fi astfel potrivit încât secțiunile să fie ceva mai groase (dacă nu urmărim să obținem pentru studiu și primele cupe). In acest fel piesa este nivelată perfect și se poate ajunge la profunzimea dorită. Apoi potrivim reglatorul la un număr mai mic de microni și începem secționarea.

§ 291. — Fiecare mișcare a cuțitului execută o secțiune. Cupele rezultate înfășurate în sul sau ușor îndoite, albicioase, trebue luate una câte una de pe cuțitul sau de pe suportul piesei când cad aici, cu o pensulă umedă sau cu degetul umed și cufundate apoi într'un cristalizor cu apă. Aici ele se desghiață și se întind.

Intre timp, dacă piesa s'a desghețat sau cuțitul nu mai e suficient de rece (se observă cum secțiunile se topesc imediat și se întind pe cuțit), se repetă răcirea.

Trebue să fim atenți la desghețarea piesei, pentrucă se poate deslipi și să pierdem astfel o bună parte din ea, prin secționare.

§ 292. — Cupele obținute prin această metodă au în general o grosime de peste 10 μ, mai ales cele de țesuturi mai dure cu mult conjunctiv. Piesele mai omogene, cu o consistență mai scăzută, cum este creierul, se pot tăia și sub 10 μ.

§ 293. — Metoda congelației prezintă însă și numeroase neajunsuri: în primul rând piesele sunt uneori foarte greu de secționat, cupele ies sfărâmicioase și până la urmă nu rămân din ele decât fragmente. Metoda nu se pretează la un studiu mai delicat, secțiunile fiind groase (în general peste 10 μ) și de cele mai multe ori neregulate ca grosime. Secțiunile sunt în general foarte fragile, manevrarea lor trebuind făcută cu foarte multă atenție.

§ 294. — Trecerea secțiunilor prin diverșii coloranți trebue să se facă cu atenție cu ajutorul unei spatule și al unui ac fin de metal sau de sticlă, tras la flacără. Se preferă acul de sticlă, care este mult mai puțin brutal și nu rupe secțiunile. Secțiunile se pot păstra câtva timp dacă le ținem într'o solutie de formol 10%.

§ 295. — Se va ține seama și de următoarele:

— Dacă piesa este prea rece, se va opri tăierea ei și se va aștepta puțin, până se mai desghiață.

— Piesa este ținută cu degetul pe suport până se prinde bine. *Inghețarea ei* este apreciată după albirea ei, care începe dela bază. Când toată piesa s'a albit se pune în mișcare cuțitul. In prealabil se controlează reglatorul grosimii secțiunilor.

— Cuțitul trebue neapărat mișcat până la refuz, altfel suportul piesei nu se ridică suficient.

— Ventilul bombei de bioxid de carbon ca și celelalte ventile nu se deschid decât în momentul când toate pregătirile sunt făcute.

— După terminare, se închide întâi ventilul tubului, apoi se deschid celelalte ventile, pentru ca gazul ce se găsește pe tuburi să iasă. După aceasta se închid toate ventilele.

METODELE DE INCLUDERE

§ 296. — Includerea unei piese constă în impregnarea ei cu o anumită substanță, care îi conferă astfel noi proprietăți în ceeace privește consistența, omogenitatea și elasticitatea.

§ 297. — In tehnica de histopatologie se folosesc următoarele metode de includere: includerea în parafină, în celoidină, în parafină-celoidină și în gelatină. Pentru fiecare metodă se folosește deci o altă substanță, sau un anumit amestec de substanțe.

§ 298. — Necesitatea includerii decurge din însești inconvenientele și lipsurile metodei congelației. Astfel, includerea conferă pieselor o consistență favorabilă pentru a fi secționate; sau transformă în blocuri secționabile piese de organe cavitare (cum este ochiul), care altfel ar fi uneori de-a-dreptul imposibil de lucrat. Secțiunile obținute prin includerea pieselor pot fi supuse apoi unor tehnici de colorație, altfel neexecutabile. In sfârșit, includerea pieselor permite o mai bună

păstrare a lor, şi în special a unora dintre componenţii tisulari, întrucât menţinerea îndelungată în fixatori, dacă nu e imposibilă, cum se întâmplă cu unii fixatori, în orice caz determină modificări în constituţia ţesuturilor (de exemplu, pierderea colorabilităţii de către germenii din ţesuturi, modificări în colorabilitatea conjunctivului, etc.). Fragmentele de piese sau piesele incluse sunt şi mult mai comod de păstrat, având un volum redus.

§ 299. — Alegerea uneia sau alteia dintre metodele de includere este în funcţie de comoditatea executării metodei, de scopul urmărit, de posibilităţile de lucru şi de caracteristicile piesei respective.

§ 300. — Includerea în parafină este aplicabilă în general oricărui ţesut sau oricărei piese. Ea permite executarea unor secţiuni subţiri şi în serie, includerea făcându-se într'un timp relativ scurt şi după o tehnică simplă. Odată incluse, piesele pot fi păstrate timp foarte îndelungat în blocuri. Metoda are o serie de inconveniente, ca dispariţia lipoizilor şi grăsimilor din ţesuturi din cauza substanţelor folosite, ratatinarea pieselor, destul de importantă, şi limitarea ca întindere a pieselor de inclus (piesa nu trebue să depăşească 7—8 cm/3—4 cm).

§ 301. — Includerea în celoidină este indicată pentru piese mari necesitând secţionarea lor pe suprafeţe întinse (de exemplu, suprafaţa unei emisfere cerebrale; este indicată deasemenea pentru piesele care nu suportă căldura necesară în cursul includerii în parafină (de exemplu pielea, ţesutul muscular neted, etc.), pentru evitarea ratatinării (foarte importantă pentru sistemul nervos, ochi, etc.), ca şi pentru prelucrarea pieselor care prezintă cavităţi sau părţi foarte diferite în ceeace priveşte consistenţa lor. Metoda prezintă desavantajul de a nu permite o secţionare atât de subţire ca după includerea în parafină. Inconvenientul cel mai important al metodei este însă durata lungă de timp pentru includerea pieselor şi exigenţa necesară în executarea tehnicii.

§ 302. — Metoda includerii în parafină-celoidină prezintă avantajele celor două tehnici arătate, cu inconvenientul dificultăţii de realizare şi dificultatea de a face secţiuni în serie.

§ 303. — Includerea în gelatină are un câmp de aplicabilitate mult mai restrâns, şi anume este indicată pentru ţesuturile laxe, care se distrug uşor şi care trebue tăiate lá rece în cupe subţiri. Ea poate fi utilizată şi pentru cercetările de finețe, întrucât retractilitatea pieselor este aproape inexistentă. Includerea în gelatină este aplicabilă şi pentru studiul grăsimilor şi lipoizilor. Prezintă marele desavantaj că adesea gelatina se colorează intens şi îngreunează examinarea microscopică.

§ 304. — Ca principiu general pentru includerea unei piese este necesar ca, în momentul în care piesa ajunge în substanţa de includere (parafină, celoidină, gelatină), ea să fie imbibată de lichide miscibile cu substanţa respectivă. Ca urmare, după spălarea pieselor de fixator, ele trebue trecute printr'o serie de lichide, care până la urmă să fie miscibile cu substanţa de includere. Substanţele lichide utilizate în

acest scop, ca şi modul lor de întrebuinţare, sunt, până la un punct, caracteristice fiecărei metode.

INCLUDEREA IN PARAFINĂ

§ 305. — Includerea în parafină este metoda cea mai folosită în lucrul curent al histopatologistului, cu excepţia sistemului nervos şi a câtorva cazuri speciale. aşa cum am văzut şi mai sus.

Includerea în parafină constă în impregnarea şi montarea piesei în parafină. In acest scop, metoda prezintă următorii timpi: deshidratarea, clarificarea, parafinarea şi includerea propriu zisă (turnarea piesei).

§ 306. — Aceşti timpi pot varia în sensul că ei se pot contopi (de exemplu, deshidratarea cu clarificarea) sau se pot desvolta (de exemplu, clarificarea într'un timp cu un lichid şi apoi imbibarea piesei cu un lichid miscibil cu parafina). Aceste modificări ale tehnicii clasice sunt în funcţie de substanţele lichide folosite. In sfârşit, prin folosirea anumitor fixatori (§ 275—280), deshidratarea începe din momentul fixării.

§ 307. — Necesitatea operaţiei de deshidratare derivă din neamestecarea apei cu parafina. Ca urmare, apa din ţesuturi trebue scoasă şi ţesuturile imbibate cu alt lichid. Dacă în acest caz se foloseşte alcoolul la rândul său nemiscibil cu parafina, şi acesta va trebui scos din piesă şi înlocuit cu un al treilea lichid, miscibil cu parafina. Pentru deshidratare s'au recomandat o serie de reactivi ca: alcoolul etilic, acetona, piridina, alcoolul metilic, dioxanul, etc.

In complectarea deshidratării cu alcool se pot folosi benzoatul de benzil, benzoatul de metil, salicilatul de metil, creozotul, etc. Ele realizează şi începutul clarificării.

Clarificarea se poate face cu: benzen, toluen, xilen, cloroform, acetonă, alcool amilic, etc.

In sfârşit, prin folosirea dioxanului se realizează în acelaş timp o bună deshidratare şi clarificare, acesta fiind miscibil atât cu apa, cât şi cu parafina.

§ 308. — **Prepararea parafinei.** Parafina este un complex de hidrocarburi saturate, extrase din uleiurile grele de ţiţei în care sunt disolvate. Ea este solidă la temperatura obişnuită. Parafina, aşa cum se prezintă în comerţ, în blocuri de culoare albă, sfărâmicioasă şi ca aspect inegal ca transparenţă (cu zone mai albe în massa semitransparentă) este în realitate un amestec de parafine, cu puncte de topire diferite. Astfel se găsesc parafine dela cele cu punct de topire la 36° până la cele cu punct de topire la 60°. Această parafină din comerţ, din cauza compoziţiei amestecului, nu are un grad de duritate prea mare, şi el variază în funcţie de proporţia diferitelor sale componente; mărind proporţia de parafină cu punctul de topire scăzut, duritatea parafinei scade.

Parafina din comerț nu este utilizabilă în această stare pentru lucrările de histopatologie, întrucât ea mai cuprinde componente gazoase care fac ca blocul să prezinte bule, să fie sfărâmicioasă și greu de secționat. Deaceea, înainte de a fi folosită, parafina va fi supusă unei operații menite să-i înlăture aceste lipsuri.

§ 309. — Pentru lucrările de histopatologie se va folosi o parafină cu punct de topire de 50—54°. Această parafină are avantajul de a suporta bine temperatura atmosferică din climatul nostru, mai ales în timpul căldurilor de vară, când secționarea blocurilor este mai dificilă. Această parafină, datorită consistenței sale, se pretează mai bine și pentru executarea de secțiuni subțiri, sub 5 μ, proprietate ce o conferă și țesuturilor pe care le impregnează. Parafina folosită trebue să fie cât mai omogenă, adică să fie constituită din parafine cu punct de fuziune aproximativ apropiat; în niciun caz punctul de topire nu va fi la o diferență atât de mare încât în parafina solidă să se mai găsească (să se scurgă) parafină lichidă. Omogenitatea parafinei se recunoaște prin aspectul blocului de parafină, care este uniform, semiopac, cu cât mai puține zone albicioase opace prin el. Duritatea parafinei se apreciază prin sunetul produs când lovim blocul de parafină; o duritate mai mare se traduce printr'un sunet mai clar, mai înalt. Parafina astfel aleasă va mai fi supusă însă unei serii de operații menite să-i îmbunătățească omogenitatea și consistența.

§ 310.— Pentru determinarea punctului de topire al parafinei, se aspiră într'un tub foarte subțire (de preferat capilar) o cantitate mică de parafină topită. Este lăsată apoi să se întărească și se lipesc capetele tubului. După ce s'a răcit perfect, se cufundă tubul într'un vas cu apă în care cufundăm și un termometru. Apa va fi încălzită treptat. In momentul când parafina din tub începe să se topească se notează temperatura indicată de termometru.

§ 311. — Prelucrarea cea mai simplă a parafinei constă în îndepărtarea resturilor de gaze din ea și a urmelor de parafină moale, care o fac foarte sfărâmicioasă. Pentru aceasta, parafina va fi menținută timp de câteva zile în stare topită, fără a o lăsa însă să se încălzească prea mult. Temperatura optimă este de aproximativ 70°. Parafina va fi apoi filtrată și răcită. Operația se repetă și, dacă în blocul de parafină se mai observă cele mai mici bule de gaz sau pete albicioase opace, se poate repeta aceeași operație de trei-patru ori. Procedând astfel se obține o parafină omogenă.

§ 312. — Pentru a-i da o consistență mai elastică, se adaugă parafinei astfel omogenizate ceară de albine, în proporție de 5—10%. Ceara de albine se adaugă numai după omogenizarea parafinei. Amestecul va fi topit din nou, filtrat și răcit.

§ 313. — In acelaș scop, mărirea elasticității parafinei, Mc. Clung a recomandat adăugarea de cauciuc natural. Se procedează astfel: cauciucul este tăiat în bucăți foarte mici, de 2—3 mm/2 mm și se adaugă

la parafina omogenizată și retopită, în proporție de 1%. Amestecul este supraîncălzit, timp de aproximativ 24 de ore, la 100°, agitându-l cu o baghetă din când în când. Apoi se filtrează și se răcește.

Nu este recomandabilă o supraîncălzire peste 100° și nici nu trebue să dureze mai mult de 24 de ore, pentrucă se produce o degradare a parafinei din cauza reziduurilor care se formează. Respectând aceste indicații, se obține într'adevăr o parafină superioară din punctul de vedere al secționabilității sale.

§ 314. — O prelucrare a parafinei cu rezultate foarte bune, care dă o parafină perfect omogenă, cu o mare capacitate de tăiere în condiții de răcire chiar mai slabe a blocurilor, este următoarea (după C. Vasilescu): 1) Se execută omogenizarea parafinei ca la § 311. 2) Se adaugă apoi ceara, în proporție de 10—15% și se topește din nou, amestecându-se bine. 3) După câteva ore se adaugă în amestecul topit pământ activ în proporție de 0,50% și cărbune animal în proporție de 1%. Se încălzește totul timp de 24 de ore, la 70°. Adăugarea acestor corpuri favorizează o perfectă curățire a parafinei de resturile de gaze și impurități. 5) Se filtrează și se răcește. Parafina filtrată va fi cât mai clară. 6) Se topește din nou și se adaugă cauciuc natural tăiat mărunt în proporție de 1%. Se supraîncălzește până la maximum 100°, timp de 24 de ore. 7) Se filtrează de două ori, și se răcește. Parafina filtrată trebue să fie, când e topită, perfect transparentă. Dacă parafina mai prezintă cele mai mici urme de cărbune sau pământ activ, va fi filtrată din nou.

Filtrarea parafinei se va face prin hârtie de filtru. Pentru aceasta se confecționează un con din hârtie de filtru introdus într'o pâlnie de metal, nesmălțuită. Se va încălzi pâlnia tot timpul filtrării, cu atenție însă, pentru ca să nu se aprindă parafina sau hârtia.

§ 315. — Este preferabil ca la ultima filtrare parafina să fie răcită în forme mai mici. Pentru uzul curent, aceste forme mai mici de parafină sunt mult mai practice.

§ 316. — In ceeace privește alegerea metodei prin care să se prelucreze parafina, se va ține seama, pe lângă posibilitățile de lucru și materialul disponibil, de scopul urmărit. Adică, pentru lucrările de studiu este preferabilă ultima metodă de prelucrare a parafinei, care dă un produs de o calitate superioară. Pentru nevoile curente, însă, se pot folosi cu rezultate mulțumitoare și celelalte metode.

§ 317. — Deshidratarea și clarificarea. După cum s'a mai spus, deshidratarea trebue urmată obligatoriu de clarificarea pieselor, pentru ca să poată fi apoi imbibată de parafină. Dacă însă lichidul deshidratant este totodată miscibil cu parafina, atunci timpul special de clarificare nu mai este necesar.

§ 318. — Metoda cea mai obișnuită de deshidratare este deshidratarea cu alcool etilic. Pentru aceasta sunt necesare mai multe alcooluri, de concentrații diferite. Piesa este trecută prin alcooluri din ce în ce mai

concentrate, până la alcool absolut. In urma acestei operații, apa din piesă este înlocuită de alcool.

§ 319. — Prepararea alcoolului de diferite concentrații. Pentru a prepara o soluție alcoolică $B\%$ dintr'o soluție $A\%$, se iau B părți din soluția A și se adaugă $A-B$ părți de apă distilată. Exemplu: pentru prepararea unui alcool de 70° din alcool 96°, se iau 70 părți alcool 96° și se adaugă 26 părți (96—70) de apă distilată.

Pentru a obține o anumită cantitate C de soluție $B\%$, dintr'o soluție $A\%$, se aplică formula $C \times \frac{B}{A}$ cc, al cărei rezultat indică cantitatea de soluție A necesară, care, complectată până la C cu substratul de diluție, să ne dea cantitatea dorită (C) de concentrație dorită (B). Exemplu: dorim să obținem 100 cc alcool de 80° din alcool 96°. Aplicând formula, $100 \times \frac{80}{96} = \frac{8000}{96} = 73{,}95$ cc. Vom lua deci 73,95 cc de alcool 96° și complectăm până la 100 cc cu apă distilată (26,05 cc). (Vezi și tabelul).

§ 320. — Prepararea alcoolului absolut din alcool etilic. Este recomandabil să se prepare din alcool etilic de 95—96°.

§ 321. — Metoda cu var nestins. Se pun într'o sticlă bucăți de var nestins (CaO) până la umplere și se toarnă apoi în sticlă alcool de 95—96°. Bucățile de var trebue să depășească alcoolul. Apa este scoasă în urma reacției: $CaO + H_2O = Ca(OH)_2$.

§ 322. — Prepararea rapidă a alcoolului absolut cu var nestins. Vasul se umple cu CaO sau cu C_2Ca (carbid) până la jumătate și apoi cu alcool, pentru ca să nu se spargă în urma formării rapide de hidrat de calciu. Alcoolul se fierbe cu CaO timp de 1—2 ore pe baie de apă, într'un vas cu refrigerent ascendent. După ce a început să fiarbă se distilează, refrigerentul fiind ținut orizontal. Dacă alcoolul conține mai mult de 5% apă, se va repeta operația de două— trei ori. *Atenție la foc!* Alcoolul, ca și acetilena formată în cursul deshidratării cu carbid, sunt inflamabile.

§ 323. — Prepararea alcoolului absolut cu sulfat de cupru. Sulfatul de cupru amorf, pentru a deveni sulfat de cupru cristalizat, are nevoie de 7 molecule de apă. El fixează cu rapiditate apa. Acest fenomen are aplicare practică în prepararea alcoolului absolut. Timpul I cuprinde *calcinarea sulfatului de cupru cristalizat* (albastru). Aceasta se face într'un vas de tuci, într'o capsulă de porțelan sau o tavă de metal, la o flacără potrivită, agitând din când în când cu o baghetă de metal sau sticlă. Sulfatul de cupru se socotește calcinat când, din cristale albastre, a devenit un praf de culoare albă-cenușie. Nu trebue folosită o flacără prea puternică! Iritant puternic al căilor respiratorii. *Nu inhalați!* Timpul II, *deshidratarea alcoolului*, se face prin punerea acestuia în contact cu sulfatul de cupru calcinat. Intr'un borcan cu dop șlefuit se pune un volum sulfat

de cupru calcinat și două volume alcool 95—96%. Din când în când se agită cu o baghetă, apoi se lasă să se sedimenteze. Agitarea se repetă de câteva ori în 24 de ore.

Când sulfatul de cupru a devenit albastru, se trece alcoolul în al doilea borcan, în care se pune sulfat de cupru în alcool în aceeași proporție ca mai înainte. La albăstrirea sulfatului de cupru din acest borcan, alcoolul se trece iar (de data aceasta în al treilea borcan) cu aceeași proporție de sulfat și alcool (1+2). De obicei este suficientă menținerea alcoolului în fiecare borcan câte 24—48 de ore. In 4—5 zile alcoolul este deci deshidratat.

Se filtrează alcoolul, acoperind pâlnia cu un capac Petri. Alcoolul absolut se ține într'o sticlă perfect închisă. Cu această metodă nu obținem un alcool perfect absolut, dar pentru uzul curent este perfect utilizabil. Alcoolul are urme de acizi.

§ 324. — Proba alcoolului absolut. 1) Se picură o picătură de alcool absolut în xilen, toluen sau benzen. Dacă picătura nu lasă o urmă turbure, atunci se consideră că alcoolul nu conține nici 3% apă. 2) Se aruncă în alcool foarte puțin carbură de calciu. Dacă alcoolul conține apă, se degajează acetilenă (ușor de recunoscut prin miros) și se turbură datorită formării de hidrat de calciu. 3) Urmele sunt depistate adăugând alcoolului de cercetat aproape 1 mg antrachinonă și 4 mg amalgam de sodiu. Dacă alcoolul conține apă se produce o colorație roșie. Dacă e perfect absolut, se produce o colorație verde.

§ 325. — Pentru deshidratare va fi folosit pe cât posibil alcool etilic pur. Excepție face amestecul de alcool etilic cu alcool metilic. Amestecul alcool-benzen (toluen, xilen) nu poate fi folosit decât la trecerea dintre seria alcoolurilor și benzen (toluen, xilen).

§ 326. — Deshidratarea cu alcool etilic se face prin trecerea pieselor în alcool de concentrații din ce în ce mai mari. Se începe cu alcool 80° și se trec piesele apoi prin alcool 90°, alcool 96° și de două-trei ori prin alcool absolut. Durata menținerii preparatului în fiecare alcool este determinată de mărimea și calitatea obiectului. Astfel, pentru piesele cu grosime până la mm sunt suficiente 6—8 ore în fiecare alcool, iar cu cât piesa este mai mare, durata menținerii ei va fi mai mare, putând ajunge la 12 ore pentru fiecare alcool. Pentru lucrări mai fine, de histologie, se recomandă trecerea pieselor prin alcooluri începând dela diluții mai mici, pentru ca să împiedicăm ratatinarea. Ordinea lor ar fi: alcool 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96°, absolut. Durata menținerii lor în aceste diluții de alcool se apreciază pe aceleași criterii ca mai sus. Dacă spălarea pieselor de fixator s'a făcut în alcool, atunci deshidratarea continuă prin trecerea piesei într'un alcool cu o concentrație imediat superioară celui folosit pentru spălarea piesei.

Trebue subliniat că durata menținerii pieselor, în alcool absolut nu trebue să treacă de 24 de ore, pentru a evita întărirea pieselor (ceeace ar determina o secționare dificilă).

§ 327. — Trecerea pieselor prin alcool are ca urmare totdeauna ratatinarea, care ajunge până la 5—10% din mărimea inițială. Ratatinarea este inevitabilă, indiferent cum crește concentrația alcoolului, ea poate varia numai în ceeace privește intensitatea. Se consideră că intensitatea ratatinării este mai mică dacă concentrația alcoolului se face treptat, în salturi foarte mici. Se recomandă astfel pentru lucrări de finețe mărirea concentrației alcoolului, picătură cu picătură. In general, însă, chiar pentru lucrările de finețe este suficientă creșterea concentrației din 10 în 10. Mai mult, unii autori recomandă folosirea directă a alcoolului absolut în sensul menținerii piesei numai în alcool absolut timp de 24—36 de ore.

§ 328. — *In lucrul nostru curent* preferăm folosirea unei serii de alcooluri începând dela alcool 80° la 90—96° și de două-trei ori alcool absolut. In ceeace privește durata menținerii pieselor în alcool, rămân valabile indicațiile de mai sus.

§ 329. — Pentru o mai bună pătrundere a alcoolului în piesă aceasta trebue pusă în contact cu el pe toate suprafețele. Lucrul este posibil dacă preparatele sunt așezate în timpul deshidratării pe hârtie de filtru sau vată de sticlă. Se poate deasemenea ca piesa să fie suspendată în alcool printr'un fir de ață care trece printr'unul din colțurile ei sau fiind legată într'un tifon, prins de dopul borcanului.

§ 330. — **Clarificarea pieselor după deshidratarea în alcool** este necesară întrucât alcoolul nu este miscibil cu parafina. Deaceea, lichidul folosit trebue să scoată alcoolul din piese, să imbibe piesa și să fie miscibil cu parafina. In acest scop se folosesc în mod curent toluen, benzen sau xilen. Dintre aceste lichide, cel mai preferabil este benzenul, care prezintă avantajul de a întări cel mai puțin piesele. Acesta este și cel mai volatil.

§ 331. — In general se folosesc trei băi din aceste lichide clarificatoare. Durata menținerii unei piese în fiecare baie variază în funcție de mărimea piesei. Pentru piesele mici, până la 1 cm, sunt suficiente în general câte 8 ore în fiecare baie, deci în total 24 de ore.

O bună clarificare a piesei (care presupune o bună deshidratare anterioară) se traduce prin semitransparența piesei și aspectul său perfect curat la suprafață. Dacă piesa este sidefie la suprafață, sau dacă prin agitare lasă un nor fin în lichidul clarificator, piesa nu este bine deshidratată. Incomplecta deshidratare și clarificare a piesei determină întărirea ei în parafină și o anevoioasă secționare mai târziu.

Reactivii folosiți pentru clarificare trebue să fie perfect puri, în sensul să nu conțină nicio urmă de apă. Amestecurile între benzen, toluen și xilen sunt permise, acțiunea lor fiind similară.

§ 332. — **Bateria de deshidratare și clarificare** poate fi formată astfel: *cinci* alcooluri de concentrații crescânde: 90°, 96°, alcool absolut, alcool absolut, alcool absolut și din *trei* băi de benzen, toluen sau xilen.

Durata menținerii pieselor în fiecare borcan este aceea indicată la fiecare capitol în parte.

La trecerea dintr'un borcan în altul, piesele trebue ușor svântate de lichidul care le îmbibă cu hârtie de filtru. Piesele nu trebue ținute însă un timp mai îndelungat în afara borcanului, pentrucă se usucă, ceeace atrage după sine ratatinare cu modificări importante în structura lor.

§ 333. — Metoda expusă până aici dă rezultate bune cu condiția folosirii unor lichide de cea mai bună calitate. Ea prezintă totuși neajunsul de a nu permite totdeauna o bună deshidratare, fapt care atrage neplăceri în cursul celorlalți timpi din prelucrarea lor. *Pentru evitarea acestui neajuns s'a recomandat introducerea unui reactiv intermediar între alcool și benzen (toluen sau xilen).* In mod obișnuit în acest scop poate folosi benzoatul de metil, salicilatul de metil sau creozotul. Acest reactiv intermediar are de scop să desăvârșească deshidratarea și să înlocuiască totodată alcoolul care imbiba piesa.

§ 334. — Benzoatul de benzil, de metil sau benzoatul de metil-celoidină necesită tratarea ulterioară a piesei cu benzen. Se folosesc două-trei băi din acest reactiv. Menținerea piesei în fiecare baie variază după mărimea ei. Indicația cea mai precisă ne-o dă însuși aspectul piesei, care trebue să devină semitransparentă. In orice caz, piesa nu se strică dacă e ținută mai mult. Trecută apoi în benzen, piesa nu trebue să devină sidefie sau să lase un nouraș alb când este agitată. Metoda dă rezultate foarte bune în general.

§ 335. — In locul benzoatului de metil poate fi folosit creozotul. Sunt suficiente două băi de creozot. Acțiunea sa se manifestă deasemenea prin clarificarea piesei. După creozot, piesa va fi trecută deasemenea prin două băi de benzen. Creozotul, deși este un foarte bun deshidratant și desalcoolizant, totuși nu-l recomandăm din cauza neajunsului ce-l aduce prin arderea pieselor ținute mai mult timp în el. Din această cauză, când va fi totuși folosit, se va face cu multă prudență, căutând a nu lăsa piesa în el mai mult de 6 ore pentru fiecare baie.

§ 336. — *Un reactiv mult mai convenabil și cu rezultate foarte bune este salicilatul de metil.* Se intercalează, între alcool și benzen, trei băi de salicilat de metil. Durata menținerii pieselor în fiecare salicilat variază, după mărimea lor, între 3—6—8 ore. Piesele trebue să devină semitransparente. Durata menținerii în fiecare baie poate fi indicată și de căderea piesei la fundul vasului (în momentul trecerii în salicilat, piesa plutește). Această metodă este folosită cu foarte bune rezultate și o recomandăm în mod special, cu atât mai mult cu cât reactivul este ieftin și relativ simplu de procurat.

§ 337. — Bateria care folosește și un reactiv intermediar pentru clarificare are deci următoarea schemă: 5 băi de alcool de concentrații crescânde (90°, 96°, absolut, absolut, absolut), 2—3 băi reactiv intermediar (benzoat de metil, creozot, *salicilat de metil*), 2 băi de benzen.

Durata menținerii pieselor în aceste băi va fi: câte 3—8 ore pentru fiecare alcool, câte 2—6—8 ore pentru fiecare baie de salicilat, câte 4—6 ore pentru fiecare baie de benzol.

§ 338. — Pentru piesele cu consistență dură (țesut conjunctiv abundent, țesut osos, etc.) trebue atrasă atenția asupra *folosirii glicerinii în cursul deshidratării*. Piesele imbibate cu glicerină își păstrează elasticitatea. Totodată: timpul necesar pentru menținerea pieselor în alcool absolut scade, evitând astfel întărirea pieselor. Se folosește glicerina anhidră.

Procedeul este următorul: după fixare (eventual decalcificare), piesele se spală și sunt tratate cu un amestec de alcool 70° și glicerină în părți egale. Se lasă aici timp de 24 de ore. Se trec apoi piesele prin două băi de glicerină anhidră pură, timp de 24 ore, urmate apoi de două băi de alcool absolut și un clarificator bun (preferabil esență de cedru). Apoi piesele sunt trecute în parafină.

§ 339. — In locul lichidelor clarificatoare văzute, se poate folosi esența de cedru (nu ulei de cedru!). Esența de cedru este miscibilă cu parafina și totodată un deshidratant puternic, așa încât deshidratarea poate să folosească alcool de 95°, alcoolul absolut ne mai fiind necesar. Bateria va fi făcută deci din trei băi de alcool 96°, alcool 96°, alcool 96° și trei băi de esență de cedru.

§ 340. — **Clarificarea cu alcool amilic.** După deshidratarea pieselor în alcool etilic, acestea pot fi trecute pentru clarificare în alcool amilic. Alcoolul amilic are avantajul de a deshidrata piesele concomitent cu clarificarea lor. Este un reactiv care dă foarte bune rezultate; însă prezintă desavantajul de a fi un puternic iritant pentru căile respiratorii, din care cauză manipularea pieselor în timpul trecerii lor prin alcool amilic se va face cu prudență, iar băile vor fi totdeauna bine închise.

Se folosesc trei băi de alcool amilic. Fiind miscibil cu parafina topită (încălzită) nu mai trebue intercalat un alt lichid (benzen, etc.), piesele fiind trecute direct în baia de parafină. Menținerea pieselor în alcool amilic variază între 2—4 ore, după mărime, pentru fiecare baie în parte.

Schema bateriei de deshidratare și clarificare, în acest caz, va fi: cinci băi alcool etilic (90°, 96°, alcool absolut de trei ori), trei băi alcool amilic.

§ 341. — Una din metodele cele mai practice pentru deshidratarea și clarificarea pieselor este metoda cu dioxan. Dioxanul este un derivat al glicolului, și este preparat prin unirea a două molecule de glicol, cu eliminarea apei; chimic, el este un bioxid de dietilen. Este solubil atât în apă, cât și în parafină topită.

Metoda dă rezultate și mai bune dacă deshidratarea începe dela fixare prin adăugarea de dioxan, fixatorilor (§ 275—277).

Pentru deshidratare și clarificare se pot folosi trei băi de dioxan pur, apoi piesele se includ trecându-le prin trei băi de parafină.

Este bine să se pună pe fundul flaconului cu dioxan puțină clorură de calciu, pentru a asigura o deshidratare totală. Clorura de calciu

este insolubilă în dioxan, așa încât poate fi eliminată prin simpla filtrare.

Marele inconvenient al dioxanului este toxicitatea vaporilor săi inhalați pentru rinichi și ficat. Borcanele trebue deaceea bine închise, iar manipularea lor să se facă în camere bine aerisite.

§ 342. — **Metodele rapide de deshidratare și clarificare** folosesc numai unul, maximum doi reactivi, cu un număr redus de băi, atât pentru deshidratare, cât și pentru clarificare. In general, aceste metode le recomandăm pentru piese de dimensiuni reduse, cu un parenchim compact și nu prea dur. Nu le recomandăm pentru țesuturile bogate în grăsimi sau parenchime spongioase ca cel pulmonar, care sunt pătrunse într'un timp mai îndelungat de reactivi. Pentru metoda rapidă de deshidratare se folosesc acetona și cloroformul.

Atât acetona, cât și cloroformul întrebuințate vor trebui să fie anhidre. Se va folosi numai cloroform pro analisi. Atât acetona, cât și cloroformul, dacă nu sunt anhidre, se trec prin sulfat de cupru sau sulfat de sodiu anhidru.

§ 343. — **Proba acetonei anhidre.** Acetona anhidră, picurată în xilen, nu lasă nicio urmă, pe când dacă ea conține apă, îl turbură.

Acetona este un bun deshidratant când este anhidră, dar ea este puțin miscibilă cu parafina.

§ 344. — Cloroformul este un deshidratant mai slab, dar este mai bine miscibil cu parafina, totuși este greu de eliminat, din care cauză nu va fi folosit decât pentru piese mici.

§ 345. — In metoda rapidă deshidratarea se face cu acetonă sau un amestec acetonă-cloroform, după care să urmeze una-două băi de cloroform, din care piesele sunt trecute într'o soluție de parafină în cloroform și apoi în parafină încălzită.

Este mai bine dacă dela fixare s'a folosit amestecul format din: acetonă 50 cc, cloroform 50 cc și acid picric 10 g (Titu Vasiliu), moment dela care începe și deshidratarea.

Pentru băile de acetonă și cloroform se vor utiliza sticluțe mici (20 cc) cu un dop bun. Piesele sunt cufundate direct în ele sau sunt prinse prin puțin tifon legat de dop și trecute astfel dela o sticluță la alta.

Piesele vor fi ținute în acetonă 30—60 de minute (schimbând acetona de două ori și prin cloroform deasemenea 30—60 de minute schimbându-l de două ori). Apoi piesele sunt trecute într'un amestec de cloroform-parafină (părți egale) în care sunt ținute 30 de minute. De aici ele sunt trecute în parafina topită, în care sunt menținute 1—2 ore, după mărime. In felul acesta, în 3—5 ore piesele sunt incluse.

Se poate folosi și acetona singură pentru întreaga operație. Se trec piesele prin 3—4 băi de acetonă, urmată de parafină. Metoda însă duce la o parafinare insuficientă.

§ 346. — **Cantitatea de reactiv.** Indiferent de vasele folosite pentru bateria de deshidratare și clarificare, reactivul trebue să fie de 10—20

de ori mai mare decât piesele introduse. In felul acesta el poate acționa puternic și într'un timp relativ scurt. Decât să se folosească odată o cantitate mare de alcool este preferabilă schimbarea sa cât mai deasă.

§ 347. — **Alegerea vaselor.** Pentru bateria de deshidratare și clarificare se vor folosi vase de sticlă albă sau brună (în special pentru piesele impregnate) care să permită pe de o parte piesei să stea larg în ele și să fie introdusă o cantitate suficientă de reactiv, iar pe de altă parte o manipulare ușoară, atât a vaselor, cât și a pieselor introduse în ele.

Pentru aceasta se recomandă îndeosebi vase cilindrice, fie perfect drepte, fie borcănașe. Diametrul lor nu trebue să depășească 4—5 cm, iar înălțimea 8—10 cm. Aceste dimensiuni permit introducerea unei cantități suficiente de reactiv, evitând totodată risipa.

Vasele trebue perfect închise cu dopuri șlefuite, spre a evita atât impurificarea reactivilor, cât și evaporarea lor.

§ 348. — Pentru piesele mai mici se pot folosi eprubete cu diametrul de 1—2 cm în care se schimbă, pe rând, reactivii necesari operației date.

Tot pentru piesele mici se pot folosi sticluțe cu capacitate de 20—30 cc. Piesele sunt legate în acest caz în tifoane și suspendate în reactivul din sticlă, fiind prinse printr'un fir de ață de dop. Prin mutarea dopului dela o sticlă la alta, piesele sunt trecute prin toți reactivii doriți.

Vasele trebue etichetate, indicându-se reactivul din el și numărul de ordine din baterie. Este preferabil ca etichetele să fie parafinate, pentru a nu se șterge indicațiile notate.

§ 349. — In trecerea lor prin vasele bateriei, piesele vor purta un număr de ordine sau un semn de recunoaștere. Nu este prea recomandabilă metoda de a prinde numărul de un colț al piesei, pentrucă prin acest procedeu se poate distruge o parte din ea, uneori de mare importanță.

Deasemenea se va evita, pe cât posibil, împachetarea pieselor în tifon în trecerea lor prin baterie, tifonul reținând o mare cantitate de reactiv care este trecut astfel dintr'un vas în altul. Impachetarea în tifon va fi rezervată pentru fragmentele mici, care altfel riscă să fie pierdute. *Atenție la trecerea pieselor, să nu rămână fragmente netrecute!*

§ 350. — **Reactivii** bateriei devin după un timp turburi din cauza resturilor organice rezultate din piesele trecute prin ei. Pentru a se curăța de aceste resturi este adesea suficient să fie filtrați printr'o hârtie de filtru obișnuită. Cu timpul, reactivii devin impuri prin aportul de apă sau alcool rezultat din trecerea pieselor. Din această cauză, deshidratarea și clarificarea sunt deficiente. Spre a preîntâmpina aceste neajunsuri, reactivii trebue schimbați din când în când. Perioadele de reîmprospătare variază cu intensitatea folosirii bateriei respective.

§ 351. — Pentru economia de material nu vor fi înlocuiți toți reactivii din toate vasele, ci se va proceda în felul următor. Va fi vărsat

reactivul din primul vas al seriei respective (primul alcool, primul salicilat, primul benzen, etc.), urmând ca reactivii din aceeași serie, din celelalte vase, să fie trecuți cu un vas înapoi, așa încât ultimul vas al seriei respective să rămână gol și să se poată turna în el reactiv proaspăt. Când bateria este mai veche se poate proceda la fel cu reactivii din două borcane. In momentul când reactivul va fi mutat dintr'un vas în altul, el va fi filtrat în vasul curățit în prealabil.

§ 352. — Pentru a menține cât mai mult timp concentrația alcoolului din baterie, unii obișnuesc să lase pe fundul fiecărui vas cu alcool o cantitate mică de sulfat de cupru anhidru sau de var nestins. Deasupra lor se aranjează o hârtie de filtru. Astfel apa este în parte fixată de aceste substanțe.

§ 353. — **Purificarea alcoolului utilizat.** Alcoolul se toarnă într'un vas de sticlă sau de cupru și se distilează printr'un refrigerent. Alcoolul distilat are 80—90°. In vasul de sticlă se pun câteva perle pentru ca lichidul să nu clocotească prea puternic.

Odată cu alcoolul pot distila și unele din substanțele volatile cu care el poate fi amestecat, ca benzenul, etc. Deaceea, alcoolul de recuperat nu va fi amestecat cu aceste substanțe. Altfel, el nu poate fi utilizat ca alcool pur nici chiar după distilare.

Alcoolul poate conține cantități variabile de săruri, cum sunt cele de mercur. Pentru îndepărtarea mercurului se introduc în alcool câteva bucăți de cupru.

Iodul poate fi înlăturat punând în alcool un fragment de tub de cauciuc.

§ 354. — Probe de purificare: 1) picurând o soluție de azotat de argint, alcoolul trebue să rămână limpede; 2) după evaporare nu trebue să rămână reziduu, sau foarte puțin; 3) alcoolul rectificat nu trebue să lase niciun miros străin sau prea puternic; 4) hârtia de turnesol nu trebue nici să se roșească, nici să se albăstrească.

§ 355. — Alcoolul amestecat cu substanțe volatile cu care distilează împreună poate fi rectificat ușor prin distilare pe carbură de calciu și utilizând un refrigerent ascendent, cu reflux.

§ 356. — **Purificarea benzenului.** Benzenul impur se fierbe câteva ore sub refrigerent ascendent, cu cărbune animal, și se distilează. Produsul obținut prin distilare se pune în contact cu sodiu metalic și se redistilează apoi la 81°. Fierberea și distilarea se fac pe o baie de ceară, încălzită la 105°. *Atenție mare la foc!* Fără o instalație perfect aranjată nu trebue încercată această operație!

§ 357. — **Recuperarea toluenului, benzenului sau xilenului.** Folosirea acestor reactivi determină încărcarea lor cu numeroase impurități (îndeosebi alcool și grăsimi)! Alcoolul și urmele de fixator se îndepărtează prin adițiune de apă alcalină. Pentru 5—6 litri de toluen se folosește 1 litru de carbonat de sodiu (10%). Se agită mai multe zile pentru a se emulsiona bine. După separare se decantează și se filtrează pe hârtie

muiată în toluen pur. Pentru a îndepărta şi apa care mai e reţinută, se tratează cu carbonat de sodiu anhidru, în proporţie de 10 g. pentru 1 litru toluen, timp de 2—3 zile, agitând mereu. Grăunţele nu împiedică emulsionarea în parafină. Pentru îndepărtarea lor trebue distilat toluenul recuperat.

PARAFINAREA

§ 358. — După deshidratare şi clarificare, piesele imbibate cu lichide miscibile cu parafina vor fi trecute în băile de parafină, care conţin parafină lichidă, la o temperatură de 5 .°. Trecerea se poate face direct într'o baie de parafină sau prin interpunerea unui amestec din parafină cu lichidul miscibil care imbibă piesa, amestec saturat în parafină (rămâne puţină parafină nedisolvată). Vasul conţinând acest amestec este păstrat de obicei la 35—40°, deasupra etuvei de parafină. Se foloseşte îndeosebi amestecul benzen-parafină.

§ 359. — Durata menţinerii pieselor în amestecul cu parafină variază în funcţie de mărimea piesei şi densitatea ei, între o oră pentru piese până în 5 mm şi 6 ore pentru piesele mari. Totuşi, menţinerea prea îndelungată a pieselor în acest amestec trebue evitată, pentrucă ele pot deveni dure şi greu de secţionat.

§ 360. — Parafinarea se face trecând piesa prin trei băi de parafină, totdeauna în aceeaşi ordine. Aceasta pentrucă prima baie mai conţine totdeauna urme din lichidul care imbibă piesele (benzen, alcool amilic, acetonă, etc.).

§ 361. — Durata ţinerii pieselor în parafină depinde de mărimea şi consistenţa lor. Astfel, piesele sub 1 mm grosime au nevoie de cel puţin 1 oră pentru fiecare baie (total 3 ore), piesele în grosime de 2—5 mm de 2—3 ore (total 8—9 ore), iar cele de 5—10 mm de 8 ore (total 24 de ore). Piesele mai mari vor fi ţinute una sau mai multe zile. Se va ţine seama şi de structura ţesuturilor, şi anume, ţesuturile mai laxe care sunt pătrunse mai uşor, vor fi ţinute mai puţin timp decât cele dure şi consistente, care sunt pătrunse mai greu de parafină. Menţinerea pieselor în baia de parafină, nu trebue prelungită peste necesităţi, întrucât atrage ratatinarea prea mare a pieselor.

§ 362. — Pentru lucrările histologice, spre a împiedica ratatinarea, se recomandă de unii ca piesele să nu fie trecute direct într'o parafină cu punct de fuziune mare ci, mai întâi, printr'o parafină cu punct de topire la 35° în care sunt menţinute câteva ore.

In acelaş scop se mai recomandă trecerea pieselor printr'o baie dintr'un amestec de parafină cu ulei de parafină, în care sunt menţinute câteva ore.

§ 363. — Băile de parafină trebue menţinute la o temperatură imediat superioară punctului de topire al parafinei respective. Folosind o parafină cu punct de topire la 52—53°, menţinem baia de parafină la o

temperatură de 54—55°. Temperatura nu trebue ridicată mai sus, întrucât produce întărirea şi ratatinarea pieselor.

Vasele în care se ţine parafina vor fi de sticlă, cilindrice, cu o capacitate de cca 80—100 cc. De preferat să fie vase mai puţin înalte decât late, spre a permite evaporarea tuturor reactivilor volatili care imbibă piesele.

§ 364. — Pentru a realiza menţinerea băii de parafină la temperatura dorită se folosesc etuve speciale sau plăci metalice.

Etuvele se găsesc în comerţ, iar cele care funcţionează cu electricitate sunt prevăzute cu un dispozitiv special pentru reglarea temperaturii. Regulatoarele obişnuite sunt cu mercur sau metalice. Etuva va avea montat un termometru astfel instalat încât să indice temperatura din interiorul ei. Etuva poate fi încălzită cu electricitate şi, mai rar, cu gaz sau lampă de petrol.

De subliniat că în etuva de parafină nu se va introduce nimic altceva. Se vor evita îndeosebi apa, alcoolul, benzenul, toluenul, xilenul, care, amestecându-se cu parafina, o degradează, împiedicând parafinarea. Din când în când etuva va fi deschisă spre a se îndepărta substanţele volatile din ea şi a purifica astfel parafina de resturile de aceste substanţe.

§ 365. — In lipsa etuvei, baia de parafină poate fi întreţinută la temperatura dorită, încălzind-o pe o placă metalică. Se recomandă un piedestal metalic în *S* care permite o încălzire indirectă a lamei pe care este aşezat vasul cu parafină.

Şi în acest caz temperatura băii va fi supraveghiată, cu ajutorul unui termometru. Totuşi, se poate aprecia punctul optim de menţinere a temperaturii observând ca baia să prezinte în permanenţă o fină pojghiţă de parafină la suprafaţă sau pe pereţii vasului. In acest fel, temperatura este imediat superioară punctului de fuziune al parafinei.

§ 366. — Intrucât şi parafina se impurifică, după un timp, prin amestecarea cu substanţele volatile din piese, se recomandă înlocuirea ei la anumite intervale, în funcţie de intensitatea folosirii ei.

Turnarea blocurilor şi montarea pieselor

§ 367. — După includerea pieselor în parafină, ele trebue montate în blocuri de parafină spre a putea fi, ulterior, secţionate. Pentru formarea acestor blocuri se vor folosi tăviţe metalice, bare metalice speciale (bare Leuckart) sau simple forme de hârtie.

§ 368. — In mod curent sunt folosite barele Leuckart pentru avantajele ce le oferă, atât în ceeace priveşte comoditatea manipulării lor, cât şi pentru uşurinţa cu care putem varia mărimea blocurilor în funcţie de mărimea piesei de inclus.

Aceste bare sunt constituite din câte două laturi, late de circa 1—2 cm, paralelipipedice, cu suprafaţa pătrată pe secţiune; laturile sunt aşezate în unghi drept. Cele două laturi ale unei bare pot fi egale sau una

din ele poate fi mai scurtă. Suprafețele laturilor barelor sunt perfect șlefuite. Este preferabil ca barele să fie făcute dintr'un metal greu, pentru a avea o mai mare stabilitate în timpul manipulării lor.

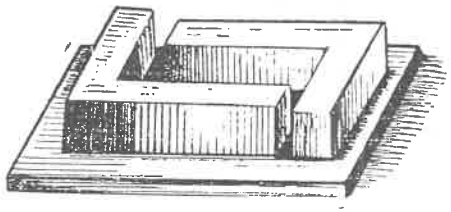


Fig. 3. — Bare Leuckardt pentru includerea în parafină.

§ 369. — Pentru turnarea blocurilor, barele vor fi așezate pe o placă metalică cu suprafețele deasemenea perfect șlefuite, pe care barele pot fi făcute să alunece ușor în sensul dorit.

Vom observa că atât barele cât și placa metalică să fie perfect curate, să nu mai păstreze nicio urmă de parafină întărită. Odată acest lucru făcut, vom încălzi ușor toate aceste piese metalice. Procedând astfel, parafina topită pe care o turnăm în forma dreptunghiulară realizată prin așezarea barelor pe placa metalică se va răci mai încet, permițând în acest timp o bună orientare a pieselor în barelor de parafină. Forma dreptunghiulară se realizează prin așezarea massa cu unghiurile de 90° față în față, capetele laturilor lor fiind în contact intim, pe placa metalică. Imprimând barelor o mișcare de alunecare, putem face ca forma constituită astfel de ele să varieze ca mărime în suprafață, după cum o cere mărimea pieselor de inclus. Această formă fiind definitivată, turnăm în ea parafină topită până la nivelul superior al formei. Apoi cu o pensă încălzită scoatem piesa din baia de parafină și o cufundăm în parafina din formă. Piesa va fi totdeauna scoasă din baia de parafină caldă. Nu se montează piesa rece, întrucât și-ar crea astfel în jur un strat de parafină rece, care ar îngreuna apoi secționarea.

§ 370. — Trebue observat ca piesa să aibă îndreptată în jos, spre placa metalică, fața care ne interesează. Totodată, cu ajutorul pensei încălzite, sau cu ajutorul unui ac de disociere încălzit, se va orienta piesa așa-fel încât cel puțin una din laturile sale, preferabil cea mai mare, să fie paralelă cu una din laturile barelor.



Fig. 4. — Cadru mobil pentru includerea în parafină.

§ 371. — După orientarea piesei, forma metalică (cu conținutul ei) se cufundă într'un vas cu apă rece. Apa nu trebue să acopere forma. In felul acesta, răcirea parafinei se face mai repede. Atragem atenția că nu este recomandabil să se folosească apă cu ghiață în ea, întrucât apa prea rece determină cristalizarea unei părți a parafinei creând inegalități de consistență în massa blocului. Lăsăm forma în apă, până ce se constitue la suprafața parafinei din formă un strat de parafină întărită, destul

de gros, care determină o retracțiea acestei suprafețe cu formarea unei scobituri. Numai în acest moment putem ridica nivelul apei deasupra formei și, eventual, folosi apă cât mai rece.

In scurt timp parafina se întărește perfect. In acest moment scoatem placa metalică cu totul din apă, și, lăsând-o să cadă dela o mică înălțime pe un plan tare, observăm cum se desprind barele și placa metalică de blocul de parafină.

Este recomandabil ca blocul să mai fie apoi lăsat în apă rece câtva timp pentru a se întări cât mai bine.

§ 372. — Unii recomandă lubrefierea fețelor barelor și plăcii care vin în contact cu parafina, cu glicerina. Practica a dovedit că acest procedeu nu este indispensabil dacă se folosește un instrumentat perfect curat.

§ 373. — In ceeace privește mărimea suprafeței formei determinată prin așezarea barelor, ea trebue să fie astfel calculată încât să rămână totdeauna în jurul piesei o ramă de parafină de câțiva milimetri.

§ 374. — In locul barelor de inclus se pot utiliza cutiuțe de hârtie sau staniol. Pentru obiectele foarte mici se pot utiliza cu succes sticle de ceasornic. Foarte practice sunt vasele mici de porțelan în care sunt păstrate acvarelele, vase care se îngustează către fund.

§ 375. — Dacă după răcirea blocului de parafină se constată că în urma formării scobiturii pe fața superioară a formei apare proeminând piesa montată, se renunță la blocul turnat. Blocul se retopește cu totul, iar piesa se va monta din nou, având grijă să turnăm dela început mai multă parafină. In niciun caz nu se va turna parafină caldă peste parafina răcită, întrucât între ele nu se creează o adeziune perfectă.

§ 376. — Orientarea pieselor mici este mult ușurată dacă înainte de a fi trecute în bateria de deshidratare sunt cufundate câteva minute într'o soluție de hematoxilină sau hemalaun. Astfel, ele se colorează în albastru-negru, fiind perfect vizibile pe fondul alb-gălbui al parafinei.

Dacă nu s'a procedat așa, atunci în momentul montării se va introduce, în parafină, la câțiva mm de piese, o hârtie colorată, care să indice atât locul acestora, cât și suprafața mai importantă pentru studiu.

§ 377. — Pentru orientarea precisă a pieselor mici, Peterfi folosește mici plăci de celoidină ce se pot obține dacă lăsăm să se întărească în vapori de cloroform o soluție de celoidină 4% într'un strat de 5 mm într'o sticlă de ceasornic umplută cu parafină. Aceste plăci se taie în tăblițe mici regulate care se imbibă și se păstrează în terpineol. Obiectele de inclus sunt trecute din seria de alcooluri în benzoat de metil (sau alt clarificator) și după imbibare sunt așezate pe o astfel de placă de celoidină așa încât direcția de secționare dorită să coincidă cu o anumită margine a plăcuței. Apoi totul rămâne sub acțiunea vaporilor de cloroform 10—15′; se întărește și se poate trece în benzen și parafină. In acelaș fel se pot monta pe celoidină și fragmente care pot fi secționate pe o nouă direcție dorită.

Se pot utiliza deasemenea mici plăcuțe de gelatină pe care obiectele sunt lipite înainte de a fi imbibate cu parafină cu benzoat de metil.

§ 378. — Blocul de parafină obținut va fi etichetat, notându-se datele în legătură cu piesa respectivă și data executării lui. Blocurile pot fi ținute în plicuri sau în cutii mici de carton, la rece. In aceeași formă se pot monta mai multe piese mici. In acest caz, acestea vor fi astfel dispuse încât după răcirea parafinei să se poată împărți blocul format din blocuri mai mici, cuprinzând fiecare o piesă.

§ 379. — Dacă însă piesa în lucru este constituită din fragmente extrem de mărunte, atunci se vor încălzi, suficient ca să mențină parafina lichidă mai mult timp, atât barele, cât și placa metalică. Apoi vom lăsa să cadă în parafină, înspre unul din colțurile blocului, toate fragmentele acestea mărunte, adunându-le într'un grup cât mai compact, cu un ac de disociere încălzit. Astfel, grupând fragmentele pe o suprafață cât mai mică, ele vor fi ușor prinse toate, pe secțiuni. Ulterior, blocul va fi aranjat în funcție de suprafața pe care se găsesc răspândite aceste mici fragmente.

PREGĂTIREA BLOCURILOR PENTRU SECȚIONARE

§ 380. — Așa cum am văzut, blocurile de parafină obținute se prezintă ca un paralelipiped cu una din fețe scobită, în timp ce pe fața paralelă cu aceasta se găsește piesa. Blocul va trebui să fie montat, fixat pe un port-obiect, pe fața opusă celui unde se găsește piesa. Pentru aceasta, trebue să netezim blocul așa încât să dispară complect scobitura lui. Apoi vom observa ca, dacă deasupra piesei se găsește un strat prea gros de parafină, să curățim și cealaltă suprafață mare, până ajungem în imediata vecinătate a piesei. In sfârșit, dacă în jurul piesei rămâne o ramă prea lată de parafină, ea trebue îngustată, așa încât să nu măsoare mai mult de 1—2 mm. Procedând în acest fel ușurăm secționarea și apoi întinderea cupelor obținute. Toate aceste operații se fac cu ajutorul unui bisturiu cu o lamă cât mai subțire.

§ 381. — Blocul astfel pregătit este lipit de un port-obiect care urmează să fie fixat la microtom. Port-obiectul este o piesă făcută de obicei dintr'un metal dur, de preferat bronz, care prezintă un pavilion săpat de numeroase șanțuri circulare pe una din fețele sale, și o coadă metalică scurtă de 3 cm, cilindrică, fixată pe cealaltă față.

Pentru a lipi blocul de parafină, port-obiectul va fi încălzit, în așa fel încât, aplicând blocul pe el, parafina să se înmoaie pătrunzând în șanțuri.

Blocul va fi potrivit în centrul port-obiectului. După ce s'a prins, cu o spatulă încălzită, topim foarte puțină parafină de jur împrejurul blocului, topind câte puțin și din suprafețele laterale ale acestuia.

Apoi lipim pe port-obiect o bucățică de hârtie pe care sunt notate date distinctive pentru piesa respectivă.

§ 382. — De observat ca port-obiectul să nu fie încălzit prea tare, pentrucă în acest caz, punând blocul pe el, parafina se topește rapid și piesa rămâne desgolită. Dacă se întâmplă acest accident, se va turna din nou piesa în bloc.

§ 383. — După fixarea blocului port-obiectul va fi scufundat în apă rece sau, mai bine, în apă cu ghiață. Se va căuta ca blocurile să se răcească cât mai bine. Ne vom feri însă ca, prin brusca răcire a port-obiectului metalic, blocurile să se desprindă de acesta din cauza diferențelor de conductibilitate a căldurii. In orice caz, înainte de secționare, se va controla fixarea blocurilor pe port-obiect. O bună răcire a blocurilor favorizează și o bună secționare a lor, datorită durității pe care o capătă atât parafina, cât și piesa.

SECȚIONAREA BLOCURILOR. MICROTOMUL DE PARAFINĂ

§ 384. — **Microtomul de parafină** servește la secționarea blocurilor. Tipul cel mai comun de microtom de parafină este tipul Minot. El

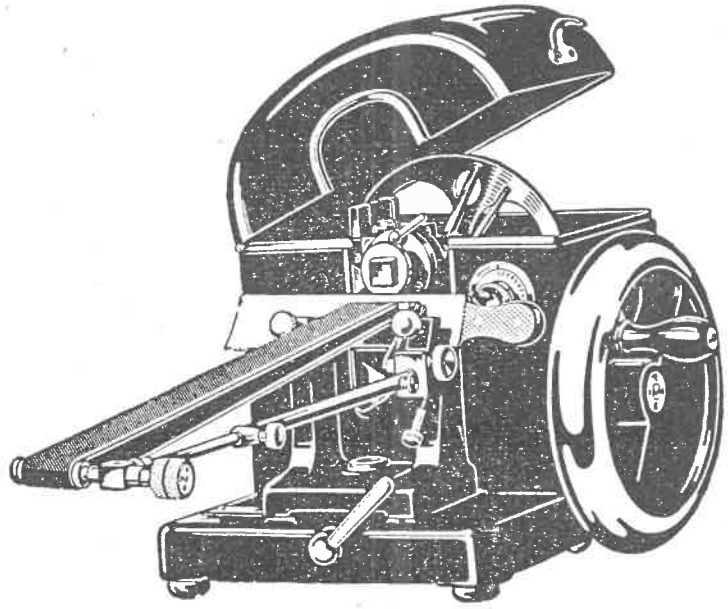


Fig. 5. — Microtom de parafină.

este compus dintr'un suport pentru cuțit, care rămâne fix în timpul secționării. Cuțitul este prins la suportul său prin două clame speciale și i se poate da inclinația dorită cu ajutorul unui dispozitiv special.

Suportul cuțitului este mobil pe o șină orizontală, putându-l apropia sau depărta de suportul port-obiectului.

Suportul port-obiectului este constituit dintr'un cleşte care se închide perfect, fixând cu ajutorul unui şurub port-obiectul. Suportul acesta este semimobil față de centrul său. El poate fi fixat în poziția dorită cu ajutorul unor cleme.

Suportul port-obiectului este mobil pe direcția verticală. El se ridică şi coboară cu ajutorul unui dispozitiv mecanic constituit dintr'o roată (pe care o pune în stare de mişcare cel ce lucrează) articulată cu un sistem de bielă, care transformă această mişcare circulară în mişcare verticală.

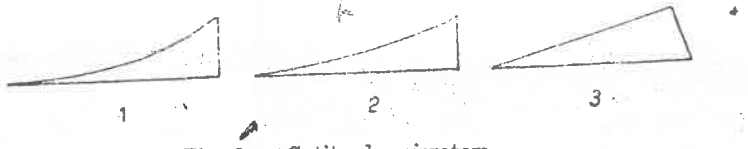


Fig. 6. — Cuțite de microtom.

Totodată, suportul port-obiectului este mobil pe linia frontală, ceeace îi permite să se apropie sau să se depărteze de cuțit.

Cu ajutorul unui dispozitiv care pune în legătură mişcarea sistemului roată-bielă-suport cu un sistem de roată dințată-arc, suportul port-obiectului înaintează la fiecare mişcare verticală cu atâția microni câți sunt indicați de viza micrometrică în legătură cu sistemul roată dințată-arc. Acest număr de microni poate fi variat prin reglarea vizei micrometrice la numărul de microni dorit.

§ 385. — Pentru secționarea blocurilor, port-obiectele pe care acestea sunt lipite vor fi fixate în suportul respectiv. Suportul va fi

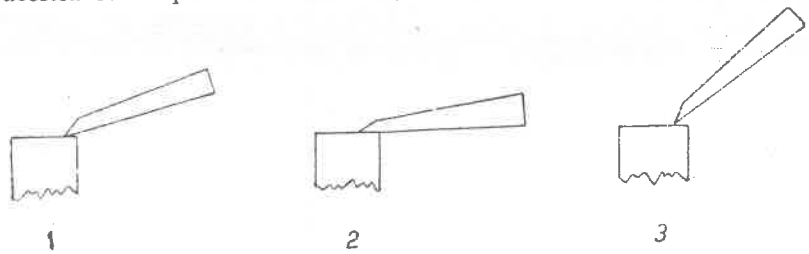


Fig. 7. — Poziția cuțitului la microtom.

fixat la rândul său în aşa fel încât suprafața blocului pe care se află să fie paralelă cu cuțitul, iar latura inferioară a acestei suprafețe să fie perfect orizontală. Este preferabil ca latura cea mai mare a piesei să fie în jos. In ceeace priveşte înclinarea cuțitului să se vadă capitolul: cuțitele de microtom.

§ 386. — Odată port-obiectul fixat, potrivim astfel cuțitul şi suportul prin alunecare încât, coborînd suportul, piesa să treacă pe lângă lama cuțitului la câteva fracțiuni de milimetru.

Potrivim apoi viza micrometrică la un număr mare de microni (20—25 μ) pentrucă primele secțiuni (cu excepția pieselor foarte mici) urmăresc nivelarea suprafeței de secționare. Cuțitul va fi astfel potrivit încât să se secționeze piesa la unul din capetele sale. Prin mişcarea roții respective se fac câteva secțiuni groase, care trebue îndepărtate. Odată piesa nivelată, se schimbă viza micrometrică la un număr mic de microni (3—6 μ) şi se continuă tăierea, în măsura dorită. Cuțitul va fi schimbat aşa fel încât să se secționeze cu partea sa din mijloc.

Secțiunile obținute acum trebue să fie subțiri, iar dacă secționarea este bună, ele sunt lipite în continuare una de alta, formând o panglică. Prinzând cu ajutorul unei pensule uscate şi cu ajutorul unui ac de disociere sau cu două ace de disociere de capetele panglicii obținute o ridicăm dela microtom şi o întindem pe o placă de carton alăturată.

§ 387. — Dacă încercând să secționăm piesele observăm că acestea prezintă o duritate mare, lovind puternic lama cuțitului şi nesecționându-se, se va lucra cu foarte mare atenție pentru a nu se şterbi tăişul cuțitului. Cauza acestei stări a piesei poate fi consistența ei, fie o deshidratare vicioasă.

Dacă piesa nu se taie în cupe continue, subțiri, ci se sfărâmă, se va încerca fie orientarea blocului în aşa fel încât secționarea să se facă în lungul structurilor fibrilare, fie o răcire mai bună a blocurilor respective, deseori aceasta fiind cauza neplăcerilor la secționarea blocurilor, fie corijarea inclinației cuțitului.

§ 388. — In cursul secționării, prin frecarea de cuțit, suprafața blocului de parafină se încarcă electric; în urma acestui fapt, secțiunile se lipesc de bloc. Depolarizarea blocului de parafină se face suflând aer din gură, deasupra lui.

§ 389. — Lipirea pe lamă a secțiunilor. Secțiunile obținute trebue lipite pe lame în vederea prelucrării lor ulterioare.

§ 390. — Lamele de sticlă folosite în acest scop vor fi perfect curățate. Pentru aceasta vor fi spălate la început cu apă şi săpun, bucată cu bucată. Apoi, trecându-le într'un vas perfect curat, lăsăm să curgă pe ele apă curgătoare timp de 24—48 de ore. De aici lamele sunt trecute în alcool etilic în care se lasă cel puțin 12 ore. Se scot, se şterg şi se aşează în cutii perfect închise. O metodă mai eficace pentru curățirea lamelor şi degresarea lor constă în menținerea lor într'o soluție de bicromat de potasiu 100 g, acid sulfuric concentrat 100 g, apă distilată 1000 cc, timp de 24 de ore, după care sunt spălate la apă curgătoare două zile. Se scot, se şterg cu o cârpă perfect curată şi se aranjează în cutii de carton acoperite.

§ 391. — De felul cum s'au executat curăţirea şi degresarea lamelor depinde soliditatea cu care sunt fixate secţiunile. Inainte de a întinde secţiunile, lamele trebue unse pe una din feţele lor cu albumină Mayer, pentru ca acestea să se lipească bine de ele.

Pentru aceasta luăm pe deget o picătură mică de albumină Mayer şi o întindem pe lamă într'un strat foarte subţire. Albumina întinsă nu trebue să facă spumă, nici nu trebue să rămână pe lame benzi groase de albumină. Lamele astfel unse sunt lăsate câteva minute înainte de a fi folosite, ferindu-le însă de praf.

§ 392. —Albumina Mayer se prepară din albuş de ou şi glicerină în părţi egale. Albuşul de ou în prealabil este bine amestecat, tăiat cu o foarfecă (fără să facă spumă) şi apoi filtrat prin hârtie de filtru. Filtrarea este foarte anevoioasă şi prelungită. După ce s'a făcut amestecul, se adaugă câteva cristale de timol spre a împiedica desvoltarea florei microbiene şi se păstrează într'o sticlă curată, la rece.

§ 393. — Hagi Paraschiv recomandă ca în loc de albumina Mayer să se utilizeze la nevoie o diluţie de gelatină în apă distilată. Se iau câteva fragmente de gelatină şi se pun într'o eprubetă de sticlă care conţine 15—20 cc de apă distilată. Se încălzeşte la flacără. In câteva minute gelatina se disolvă în apă şi diluţia este bună de întrebuinţat. Se iau cu o pipetă 2—3 cc din acest preparat şi se întind pe lamă (lama trebue bine degresată în prealabil). Intindem apoi panglica din secţiuni pe lamă şi scurgem excesul de lichid.

§ 394. — Secţiunile care vor fi impregnate argentic este preferabil să fie lipite fără albumină pe lame perfect degresate, argintul impregnând adesea şi albumina şi creând astfel artefacte.

Secţiunile vor fi lipite şi întinse pe lamă, aşezându-le cu faţa care privea spre cuţit către lamă. De altfel, această faţă a secţiunii este mai lucioasă. Pentru a întinde bine secţiunile (care prezintă cute după tăierea blocului) se folosesc două procedee.

§ 395. — *Primul procedeu de lipire* constă în întinderea cupelor, în panglică sau izolat, pe suprafaţa unei ape călduţe (38—40°), cupele fiind aşezate cu faţa dinspre cuţit pe apă. Vasul cu apă este recomandabil să fie vopsit cu negru pe feţele sale interioare, pentru ca astfel secţiunile să fie mai uşor vizibile. După întinderea panglicii sau a secţiunilor, pe apă, cu ajutorul a două ace de disociere întindem fiecare cută.

Apoi desfacem panglica, cu ajutorul acelor, în părţi mai mici (fără a rupe piesele) care să încapă pe o lamă. După ce secţiunile sunt întinse, introducem lamele, pe rând, în apă, cu faţa unsă cu albumină Mayer în sus, pe sub secţiuni. In momentul când lama este sub secţiune o ridicăm, fixând cu un ac secţiunea pe lamă. Scoatem acum lama complect din apă şi cu acul potrivim secţiunea în mijlocul lamei.

Lamele sunt aşezate apoi înclinate uşor dela vertical pe un stativ, lăsând să se scurgă lichidul de pe ele.

§ 396. — In tot timpul lucrului se va îngriji ca temperatura apei să nu scadă prea mult (pentrucă parafina nu se mai întinde), dar nici să nu crească prea mult, pentrucă parafina se topeşte şi secţiunile se pierd pe suprafaţa apei. Temperatura apei se potriveşte prin adăugarea de apă caldă sau rece, după nevoie.

§ 397. — *Al doilea procedeu* constă în întinderea secţiunilor chiar pe lamă. Pentru aceasta se picură puţină apă pe suprafaţa unsă cu albumină. Se pot utiliza şi lame neunse, dar în acest caz în apă se picură foarte puţină albumină Mayer. Lamele cu apă pe ele sunt aşezate pe o platină electrică încălzitoare, sau pe o placă metalică încălzită la un bec Bunsen sau o lampă cu alcool.

Apoi se întind pe lame secţiunile, ţinând seama de indicaţiile de mai sus, şi îndreptându-le fiecare cută cu ajutorul acelor de disociere. După întinderea cutelor, secţiunile se mai lasă un timp pe apă (care se încălzeşte treptat) până se întind foarte bine. In acest moment lamele sunt ridicate, se scurge apa, ţinând secţiunile fixate cu ajutorul unui ac de disociere. Lamele se aşează apoi într'un stativ, uşor înclinate, pentru a se scurge bine toată apa de pe ele.

Pentru estetica lamei, cupele vor fi aranjate în centru.

§ 398. — După ce lamele sunt lăsate un timp scurt pe un stativ, la aer, să se scurgă bine apa, se şterg urmele de apă şi sunt aşezate pe un alt stativ uscat. Sunt introduse astfel într'o etuvă la 37° pentru ca să se evaporeze toată apa şi secţiunile să se lipească bine pe lame. In termostat lamele sunt lăsate timp de 6—12 ore, sau chiar până a doua zi. După scoaterea lamelor din termostat, secţiunile sunt perfect întinse şi aderente de lamă.

§ 399. — **Deparafinarea şi hidratarea secţiunilor.** Secţiunile pieselor incluse în parafină şi întinse pe lame nu pot fi colorate în această stare, lichidele în care sunt disolvaţi coloranţii nepătrunzându-le. Deaceea, pentru colorare, parafina care le imbibă trebue scoasă, deci vom deparafina şi apoi vom hidrata secţiunile, întrucât marea majoritate a coloranţilor sunt solubili în apă.

§ 400. — Deparafinarea se face prin trecerea lamelor cu secţiuni lipite, uscate, prin solvenţi ai parafinei, ca benzen, toluen, xilen. Se trec prin trei vase cu solvent, ţinându-se în fiecare aproximativ un minut. Apoi lamele sunt trecute prin trei vase cu alcool 96°, în care se ţin deasemenea câte două minute, şi apoi sunt cufundate într'un vas cu apă.

§ 401. — In trecerea prin diversele vase, lamele vor fi uşor agitate prin ridicări uşoare şi cufundate din nou în vas. Dacă secţiunile se desprind însă uşor, se renunţă la această agitare a lamelor.

Folosim în special pahare Borell pentru solvenţii parafinei şi pentru alcool, paharele (în număr de şase) fiind aşezate într'un stativ de lemn. In primele trei se pun xilen, benzen sau toluen, în celelalte trei alcool, notându-se pe fiecare conţinutul şi numărul paharului.

In trecerea dintr'un pahar în altul, lamele vor fi scurse şi şterse uşor de lichid; se procedează rapid pentru a nu se usca cupele.

§ 402. — In lipsa unei baterii de deparafinare, operaţia se poate executa şi prin turnarea pe lame, pe rând, a lichidelor respective. Este preferabil ca lamele să fie aşezate în acest caz pe cristalizoare mici, stând astfel orizontale. După ce sunt acoperite de lichidul respectiv, este bine să le clătinăm.

§ 403. — In unele cazuri speciale, când piesa a fost colorată înainte de includere (de exemplu, impregnările), urmărind ca după secţionare să se monteze imediat (imbibarea cu parafină nepermiţând examinarea microscopică), se execută numai deparafinarea. Din ultimul pahar de solvent al parafinei, lama e scoasă, spălată încă odată cu xilen şi montată conform indicaţiilor tehnicii respective.

INCLUDEREA ÎN CELOIDINĂ

§ 404. — Celoidina este cel mai pătrunzător mediu; ea nu modifică ţesuturile şi deaceea metoda are o indicaţie foarte largă.

Trebue să spunem însă dela început că o bună includere în celoidină este în funcţie în primul rând de o bună deshidratare a pieselor. Deaceea, pentru deshidratare, se vor folosi câteva alcooluri absolute. Totodată, trecerea pieselor prin soluţiile cu eter determină degresarea lor, care atrage după sine degradarea celoidinei respective, cu turburarea ei. Deaceea, soluţiile de celoidină (care cuprind şi ele eter) vor fi folosite numai atâta timp cât sunt clare, băile respective trebuind deci să fie schimbate după a treia-patra întrebuinţare. Din această cauză se va lucra cu cantităţi mici de soluţie de celoidină.

§ 405. — Celoidina este un dinitrat de celuloză; este o substanţă inflamabilă şi *explozibilă*, apropiată de fulmicoton, din care cauză *trebue manipulată la adăpost de flacără*. Celoidina se găseşte în comerţ sub forma unor plăci flexibile translucide, *în cutii de tablă închise ermetic*. Aceste plăci conţin o cantitate de celoidină indicată pe eticheta cutiei respective, care este amestecată cu alcool absolut, pentru a avea o consistenţă mai moale.

§ 406. — **Prepararea soluţiilor din plăcile de celoidină.** După ce sunt scoase din cutie, placa de celoidină se taie în bucăţi mici (ca fidéaua) şi se lasă să se usuce pe o hârtie de filtru, în termostat, la temperatura de 37° sau la temperatura camerei, într'un loc ferit de foc şi umezeală. După uscare, se prepară două sau trei soluţii după metoda dorită. Soluţiile sunt preparate într'un amestec de alcool-eter părţi egale (alcoolul va fi absolut, iar eterul anhidru). Pentru metoda care foloseşte două băi de celoidină se prepară o soluţie mai lichidă de 4—5% şi una mai concentrată de 8—10%, care are consistenţa mierii de albine. Pentru metoda care foloseşte trei băi se face o soluţie de 2%, o soluţie 4% şi alta 8%.

§ 407. — Pentru prepararea soluţiei 2%, de exemplu, se procedează în modul următor: se pun 20 g celoidină uscată în 500 cc alcool absolut şi se lasă să stea 24 de ore într'o sticlă perfect închisă, agitând din când în când. In acest timp celoidina se imbibă bine, fără a se disolva propriu zis. După 24 de ore se adaugă 500 cc eter anhidru. Celoidina se disolvă acum foarte repede. Borcanul în care se face soluţia se va agita din când în când, întorcându-l şi cu dopul în jos. Procedând în acest fel, disolvarea are loc mai repede decât dacă se adaugă dela început amestecul de alcool-eter.

In mod analog se procedează şi pentru celelalte soluţii.

Disolvarea celoidinei, durează câteva zile, aşa încât este recomandabil să facem o cantitate mai mare de soluţie odată, pentru a avea şi de rezervă.

§ 408. — **Prepararea eterului absolut** se face cu sulfat de cupru sau cu CaO. Sulfatul de cupru se adaugă în proporţie de 50 părţi pentru 800 părţi eter, totul într'un borcan perfect închis. Nu se vor folosi cantităţi mai mari de sulfat pentrucă nu este necesar. Atât sulfatul de cupru cât şi varul nestins sunt cufundate în eter, fiind legate într'o hârtie de filtru, întrucât în eter ele nu sedimentează ca în alcool, turburându-se foarte uşor la cea mai uşoară clătinare a vasului. Sulfatul de cupru va fi schimbat când s'a albăstrit.

§ 409. — **Proba eterului absolut** se face cu violet de anilină. In prezenţa alcoolului, eterul se turbură. Prin tratare cu S_2C şi agitare, eterul se turbură în prezenţa apei. In orice caz este preferabil să se folosească eter sosit în ambalaj original, întrucât cel trecut prin diferite vase se poate amesteca foarte uşor cu apa.

§ 410. — Unii autori recomandă să se prepare la început o soluţie concentrată de celoidină de 8—10%, din care să se prepare apoi celelalte soluţii, diluându-le cu amestecul alcool-eter. Celoidina se disolvă şi se păstrează în borcane cu gâtul lung şi mai îngust, închise cu dop şlefuit.

§ 411. — Merculov recomandă ca în lipsa celoidinei originale să se folosească pelicule de film sau de plăci de film radiologic. Acestea sunt preparate tot din nitroceluloză, dar cu adaus de camfor. Filmul Röntgen sau pelicula cinematografică, pentru a se preta la prepararea soluţiei de celoidină, trebue să fie inflamabile, să ardă.

§ 412. — Acestea trebue supuse însă următoarei prelucrări: filmul radiologic sau cinematografic trebue la început spălat de stratul de săruri de pe el, în apă fierbinte, cu peria. Sărurile se curăţă şi mai bine dacă filmele sunt spălate cu o soluţie 40% de NaOH sau KOH, timp de 20—30 de minute. După 20—30 de minute filmele sunt trecute într'un lighean cu multă apă şi se îndepărtează stratul de săruri prin frecarea filmelor cu mâna sau cu o cârpă. (Nu se va cufunda mâna goală în soluţia bazică, ci se va lucra cu pensa). Filmele vor fi lăsate apoi în apă curgătoare 24 de ore, pentru a îndepărta orice urmă de bază de pe ele. Pe când

filmul cinematografic are sărurile depuse numai pe o parte, filmul radiologic are sărurile depuse pe amândouă feţele.

Placa de film se socoteşte bună de întrebuinţare când, după îndepărtarea emulsiei, rămâne complect curată, incoloră şi transparentă, sau este uşor gălbuie. Plăcile spălate se usucă la temperatura camerei şi pe urmă sunt tăiate mărunt. Numai excepţional se va usca placa la termostat până la 40°. Subliniem că filmele sunt foarte inflamabile, aşa încât uscarea lor nu se face niciodată la o temperatură peste 40°. Când sunt uscate, vor fi supraveghiate continuu! Nu se lasă în timpul nopţii în termostat!

Inainte de a prepara soluţiile, filmele mai trebue supuse unei operaţii speciale, pentru îndepărtarea camforului care intră în compoziţia lor. Pentru aceasta, placa odată spălată se cufundă în cloroform şi se lasă câteva zile. Apoi se scurge cloroformul (care a disolvat camforul) şi placa este tăiată mărunt şi uscat.

§ 413. — După ce s'a uscat se prepară soluţiile de celoidină cu amestecul alcool-eter, aşa cum am văzut mai sus pentru celoidină.

Pentru a obţine o soluţie cât mai clară, filmele tăiate mărunt vor fi înfăşurate într'un tifon şi astfel cufundate în amestecul alcool-eter; pentru disolvare se foloseşte un borcan cu gura largă şi cu dop şlefuit.

§ 414. — Tehnica de includere. *a)* Piesele trebue deshidratate, celoidina nefiind miscibilă cu apa. Pentru deshidratare se foloseşte alcoolul etilic, complect anhidru. Se trec piesele prin trei băi de alcool absolut. Piesele fiind mari se vor folosi borcane mari, cu gura largă, închise perfect cu dopuri şlefuite. Cantitatea de alcool va fi de 10—15 ori mai mare decât volumul piesei. Piesele se ţin în alcool, în funcţie de mărimea lor, dela 5—6 ore pentru piese de 0,5/1/1 până la 12—16 ore pentru piesele mari.

b) Apoi urmează trecerea pieselor prin trei băi de amestec alcool-eter, în părţi egale. Această trecere are ca scop atât perfecta lor deshidratare, cât şi degresarea lor. Celoidina este greu miscibilă cu grăsimile, aşa încât se va căuta ca acestea să fie cât mai bine îndepărtate. Piesele se ţin în fiecare baie câte 6—24 de ore. Vasele folosite sunt aceleaşi ca mai sus.

c) Din amestecul de alcool-eter, piesele se trec în soluţia subţire de celoidină, în care sunt ţinute 2—3 zile. Se trec apoi în soluţia concentrată de celoidină, în care sunt ţinute 1—2 zile.

Timpul de menţinere a pieselor în aceste băi de celoidină se poate prelungi, întrucât aceasta nu atrage după sine niciun inconvenient ci, dimpotrivă, o mai bună pătrundere a lor de către celoidină. Menţinerea pieselor în celoidină este în funcţie şi de grosimea şi mărimea pieselor, ca şi de consistenţa şi specificul lor. Astfel, piesele mai mari vor fi ţinute mai mult timp, la fel piesele din ţesuturi mai solide.

d) Dacă se folosesc trei băi de celoidină, după trecerea prin alcool absolut şi amestecul alcool-eter, piesele sunt ţinute câte 48 de ore în

fiecare soluţie de celoidină. Aceşti timpi sunt valabili pentru piese de 3—4 mm grosime. Pentru piese mai mari sau mai dure, ca tendoanele, acest timp se lungeşte până la o săptămână.

Se recomandă ca vasele de celoidină să fie ţinute într'un exsicator cu Cl_2Ca pentru crearea unei atmosfere anhidre.

TURNAREA BLOCURILOR ŞI MONTAREA PIESELOR ÎN CELOIDINĂ

§ 415. — Pentru montarea pieselor în celoidină se folosesc vase speciale, rotunde sau pătrate, înalte de 4—5 cm, şi care să aibă marginile cu câţiva centimetri mai mari decât latura piesei de inclus. Totodată, vor fi pregătite clopote de sticlă mai mari sau exsicatoare, în care să se facă întărirea celoidinei în care s'au montat piesele.

După imbibarea lor cu celoidină piesele se pun în unul din vasele speciale pentru montare, şi se toarnă peste ele soluţie 8% de celoidină neîntrebuinţată, în aşa fel încât să depăşească nivelul piesei cu 2—3 cm. Aceasta, întrucât celoidina, întărindu-se prin evaporarea eterului şi alcoolului, îşi micşorează volumul până aproape la jumătate. Adausul ulterior de celoidină nu are rost, întrucât el nu formează o massă continuă cu celoidina care s'a întărit.

§ 416. — Incepând din acest moment urmărim întărirea celoidinei, care se face, aşa cum am văzut, prin evaporarea alcoolului şi eterului în care era disolvată. Intărirea celoidinei trebue să se producă în mod treptat.

Pentru aceasta, vasul în care se găseşte montată piesa se introduce într'un exsicator în care se găseşte turnat acid sulfuric. Este important raportul dintre suprafaţa stratului de acid sulfuric şi spaţiul din exsicator pe de o parte şi cantitatea de celoidină pe de altă parte. Cu cât suprafaţa stratului de acid sulfuric este mai mare, cu atât procesul de întărire al celoidinei este mai rapid şi deci se obţine mai greu o îngroşare uniformă. Se vor alege deci vase cu acid sulfuric şi exsicatoare în general în raport cu mărimea pieselor.

Vasele sunt lăsate în exsicator câteva zile (1—4 zile în general), până ce celoidina şi-a redus volumul aproximativ la jumătate, întărindu-se şi căpătând o consistenţă cartilaginoasă. In acest moment întărirea se socoteşte terminată.

§ 417. — Dacă în scurt timp după introducerea vasului în exsicator se constată că s'a format la suprafaţa celoidinei o crustă, înseamnă că celoidina nu este complect anhidră, ceeace va determina o secţionare slabă.

§ 418. — Pentru a permite îngroşarea straturilor inferioare şi pentru a evita formarea de cavităţi, se va deslipi cu un cuţit stratul mai întărit dela suprafaţa celoidinei.

§ 419. — Dacă totuşi în stadiul ultim al îngroşării apar bule de aer, se adaugă puţin amestec de alcool-eter în părţi egale şi se acoperă pen-

tru proximativ 30′ vasul. Inmuindu-se celoidina, bulele se ridică singure la suprafață sau, pentru a favoriza ieșirea aerului, le înțepăm cu un ac.

§ **420.** — Este important să se aștepte o bună întărire a celoidinei pentrucă numai astfel piesele sunt bine pătrunse de celoidină și ajung să aibă pe toată grosimea o consistență omogenă, condiție fundamentală pentru buna lor secționare. Altfel straturile inferioare rămân moi și deci greu secționabile.

§ **421.** — Pentru a se obține blocuri mai tari se folosesc soluții de celoidină disolvată într'un amestec de alcool-eter, în care însă raportul eter/alcool nu este de 1/1, ci de 1,5/1—2/1. O astfel de celoidină este mult mai bună pentru montarea pieselor de ochi.

§ **422.** — După întărirea celoidinei cu reducerea volumului său la aproape jumătate, pentru o mai bună întărire a blocurilor formate se pune vasul de includere într'o cutie de sticlă cu capac, pe fundul căreia se toarnă un strat subțire de alcool 70°. Se așteaptă câteva ore apoi, până ce sub acțiunea alcoolului diluat se produce o crustă la suprafața celoidinei. In acelaș timp are loc și o scădere a volumului celoidinei. In cele din urmă, tot vasul de includere este umplut cu alcool 70° care, susținând și restul de alcool absolut din blocul de celoidină, duce la întărirea celoidinei prin sinereză (Romeis). După 24 de ore se formează un bloc atât de tare încât poate fi deslipit și scos din vas. Intărirea continuă câteva zile după scoaterea blocurilor din vas, prin cufundarea lor în alcool 70°.

§ **423.** — Blocurile pot fi păstrate în alcool 70° sau într'un amestec de alcool 70° — glicerină în proporție 2:1.

§ **424.** — Pentru întărirea blocurilor, în locul alcoolului se poate folosi cloroformul. Vasul de includere este deasemenea introdus sub un clopot, sub care se găsește și un borcan cu cloroform descoperit. Vaporii de cloroform întăresc piesa. Prin acest procedeu celoidina se întărește în 1—2 zile. Metoda prezintă însă desavantajul de a produce turburarea celoidinei, influențând defavorabil secționarea blocurilor și grosimea secțiunilor.

§ **425.** — In lipsa exsicatoarelor, pentru întărirea celoidinei, vasele de includere vor fi așezate sub un clopot de sticlă, sub care se introduce puțin var nestins. Lăsând vasele aici câteva zile, în care timp clopotul este ridicat de câteva ori pe zi pentru împrăștierea vaporilor, se constată că în curs de câteva zile celoidina se întărește.

Se poate deasemenea aranja astfel clopotul de sticlă încât să fie continuu ridicat într'o parte, asigurând în acest fel continua împrăștiere a vaporilor de eter și alcool. In acest caz vom lucra cât mai departe de surse de hidratare a mediului înconjurător. Clopotul nu trebue ridicat prea mult, pentrucă ar favoriza o evaporare prea rapidă a eterului și alcoolului, determinând întărirea neuniformă a celoidinei.

Intărirea în aceste cazuri durează mai mult decât în cazurile precedente, și anume 5—6 zile. Ea trebue condusă cu atenție, spre a nu produce

o evaporare prea rapidă. Pentru aceasta, pe lângă gradul de ridicare al clopotului de sticlă, se vor alege clopote de mărimi proporționale cu vasul de includere și cantitatea de celoidină din el. Și în acest caz celoidina se socotește complect întărită când a ajuns la o consistență cartilaginoasă, fiind totodată transparentă.

§ **426.** — Când celoidina s'a întărit suficient se scoate cu un bisturiu din vasul de includere. Apoi se fac blocurile—atâtea câte piese sunt incluse. Blocurile sunt astfel tăiate încât în jurul piesei să rămână o ramă subțire de celoidină. Blocul este tăiat în formă de cub, cu un cuțit foarte subțire.

§ **427.** — Pentru a fi secționate, blocurile trebue lipite în prealabil pe plăci de lemn, care sunt fixate în port-obiectul microtomului. Aceste plăci se fac dintr'un lemn care conține cât mai puține rășini, cum este lemnul de mesteacăn; este preferabil să nu se facă din lemn de brad sau pin, bogate în rășini. In orice caz, aceste plăci de lemn trebue tăiate așa fel încât să poată fi fixate la suportul microtomului; apoi, pe una din fețele lor mari, se trag câteva șanțuri perpendiculare între ele, ca un grilaj. Șanțurile vor fi puțin adânci. Inălțimea plăcilor va fi de 1,5—2 cm. Plăcile de lemn trebue apoi prelucrate pentru a se scoate din ele taninul și rășinile respective, care altfel se disolvă în alcoolul de 70° unde sunt menținute piesele și care colorează celoidina, scăzând secționabilitatea și calitatea ei.



Fig. 8. — Piese de lemn pentru fixarea blocurilor de celoidină.

Prelucrarea plăcilor de lemn constă în fierberea lor câteva ore în apă cu hidrat de sodiu 2%, după care sunt ținute câteva săptămâni sau luni în alcool de 80—96°; alcoolul va fi schimbat de câteva ori, până ce nu se mai colorează. Atunci plăcile se scot și se usucă la aer.

La nevoie se pot folosi și plăci de lemn, neprelucrate, dar atunci vor fi folosite numai pentru a obține rapid cupe din piesa respectivă, apoi blocurile de celoidină vor fi desprinse de pe ele.

§ **428.** — *Pentru fixarea blocurilor de celoidină pe plăcile de lemn* este necesar ca plăcile să fie perfect uscate, iar blocurile de celoidină, după ce sunt scoase din alcoolul de 70° în care sunt păstrate, să fie uscate cu grijă pe hârtie de filtru, apoi svântate la aer 10—15 minute. Numai după aceasta blocurile pot fi lipite pe plăci, altfel blocurile de celoidină se desprind ușor, aderența lor la placă fiind foarte slabă.

După svântarea lor, blocurile de celoidină, se cufundă în puțină soluție de celoidină 8%, în care sunt ținute 1—2 minute. Apoi se scot și sunt așezate pe plăcile de lemn, pe fața lor crestată, pe care se picură în prealabil 2—3 picături de soluție celoidină, apăsându-le așa ca celo-

idina să intre în şanţurile din lemn. Se lasă apoi la aer să se usuce, timp de 10—25 de minute.

§ 429. — Blocurile se lipesc şi mai bine pe suportul de lemn dacă înainte de a le cufunda în soluţia concentrată de celoidină sunt lăsate 30—60 de secunde într'un amestec de alcool-eter. In felul acesta, stratul superficial de celoidină se înmoaie şi se disolvă puţin, devenind mai aderent la placa de lemn pe care îl vom aplica.

§ 430. — După ce blocurile lipite pe plăcile de lemn s'au uscat, se cufundă cu totul în alcool de 70° unde, în 3—6 ore, celoidina se întăreşte puternic, fixând perfect blocul.

§ 431. — Blocurile este bine să fie tăiate a doua zi şi în niciun caz mai devreme de 3 ore dela lipirea lor pe placa de lemn. Dacă totuşi este necesară o cercetare mai rapidă, blocurile proaspăt lipite şi uscate la aer trebue cufundate în cloroform curat, în care ele capătă tăria necesară în 20—30 de minute.

§ 432. — Blocurile de celoidină fixate pe placa de lemn sunt păstrate înainte sau după secţionare în alcool de 70°. Alcoolul mai concentrat nu este recomandat, pentrucă el înmoaie celoidina, ceeace atrage după sine şi o secţionare dificilă, cu cupe foarte groase. Cu cât celoidina este mai moale, cu atât cupele sunt mai groase.

§ 433. — **Metoda includerii rapide în celoidină după Merculov.** Principalul inconvenient al includerii în celoidină este întinderea pe lung timp a execuţiei tehnicii. Pentru îndepărtarea acestui neajuns s'a încercat aplicarea unor metode rapide de includere în celoidină. Dela început trebue spus însă că aceste metode dau o includere inferioară faţă de metodele clasice, în sensul că secţiunile care se pot astfel obţine sunt mult mai groase şi neomogene. Metodele rapide sunt valoroase însă pentru practică, în sensul că pot deveni tehnici de lucru pentru diagnosticul urgent. Aceasta cu atât mai mult acolo unde nu există un microtom de ghiaţă sau unde nu se poate executa o includere bună şi rapidă în parafină. Includerea rapidă în celoidină se poate folosi şi afară de aceste cauze, pentru ţesuturile cu o duritate mare. Desigur că până la urmă hotărăsc experienţa personală şi condiţiile de lucru. Reproducem după Merculov o metodă rapidă de includere în celoidină, care este şi cea mai simplă şi cu bune rezultate.

§ 434. — 1) Din piesele de lucrat se taie fragmente mici groase de 2 mm şi se fixează în alcool de 96° (se poate adăuga 2% fenol), schimbând alcoolul de două ori. Fragmentele se ţin câte 3 ore în fiecare alcool. Dacă este posibil, fixarea să se facă la temperatura de 37° în termostat. Când fragmentele sunt trecute dintr'un alcool în altul este preferabil să fie scurse pe hârtie de filtru, să se svânte bine, şi se controlează ca grosimea lor să nu treacă de 2 mm. Cantitatea de alcool folosită trebue să fie suficient de mare spre a permite o bună fixare şi deshidratare. 2) Din al doilea alcool piesele sunt trecute direct în soluţie 8% de celoidină, în care se ţin 12—14 ore. 3) Fragmentele

se scot apoi din celoidină şi sunt aşezate pe suporturile de lemn, turnând peste ele puţină soluţie de celoidină. 4) Se lasă să se usuce la aer 20—25 de minute, după care 5) se cufundă în cloroform pentru 20—30 de minute. Se recomandă ca după 10—12 minute dela cufundarea în cloroform să se taie cu atenţie prisosul de celoidină direct pe fragment, descoperindu-l cât mai bine. Aceasta pentru o mai bună întărire a celoidinei care imbibă ţesuturile.

Blocurile astfel obţinute sunt mai moi decât cele obţinute prin includerea clasică, prelungită, şi din această cauză se taie în cupe mai groase, grosimea lor minimă fiind de 15 micromi. Pentru a obţine cupe cât mai subţiri, trebue să folosim cuţite cât mai bune.

435. — Tăierea blocurilor de celoidină. Pentru tăierea blocurilor de celoidină se foloseşte microtomul de celoidină, care are o construcţie specială. Tipurile microtoamelor variază, însă ele au câteva caractere comune, funcţionând principial la fel.

§ 436. — **Microtomul de celoidină** obişnuit este format dintr'un

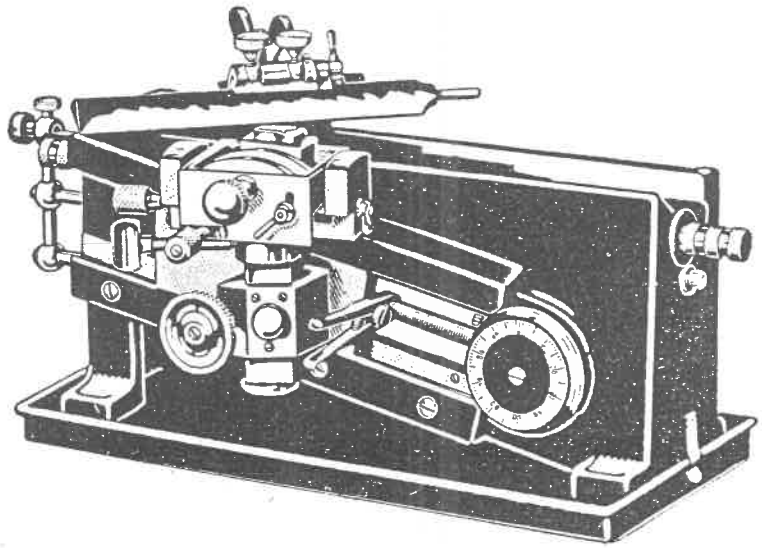


Fig. 9. — Microtom de celoidină.

schelet metalic care este totodată postamentul celorlalte piese şi care prezintă un şanţ orizontal lung pe marginea sa superioară. In acest şanţ alunecă un bloc metalic cu greutate mare, pentru a avea o cât mai bună siguranţă la mişcare, bloc metalic la care se fixează cuţitul microtomului. Cuţitul este astfel fixat încât el încrucişează oblic marginea superioară a microtomului.

Pe de altă parte, tot de scheletul metalic al microtomului este fixat port-obiectul, care susține bucățile de lemn pe care s'a fixat blocul de celoidină. Acest suport al piesei este articulat cu un dispozitiv micrometric care, împingându-l în sus, ridică piesa cu atâția microni cu câți indică viza micrometrică pe care o reglăm după dorință. Sistemul acesta de ridicare al piesei poate fi oblic sau vertical.

Ridicarea suportului piesei nu se mai face însă în mod automat prin mișcarea cuțitului ei, printr'un sistem de roată dințată, ci ea se face cu mâna. La fiecare mișcare a cuțitului vom executa o mișcare a dispozitivului de ridicare a suportului.

Tăișul cuțitului face cu marginea blocului un unghi ascuțit.

După fixarea blocului și a cuțitului facem să alunece suportul cuțitului în șanțul său. Apropiind cuțitul de blocul de celoidină, potrivim înălțimea acestuia așa fel încât prima secțiune să nu aibă o grosime prea mare, în urma căreia să se piardă astfel din piesă. Inaintând, cuțitul va executa secțiunea cu o mare parte din tăișul său.

Cu ajutorul unei pensule vom umecta continuu cu alcool 70° atât suprafața piesei, cât și cuțitul (atenție să nu se lovească tăișul). Se potrivește viza la numărul de microni dorit. Apoi, umectând după fiecare secțiune, prin alunecarea suportului cuțitului, se execută secțiunile dorite. De pe cuțit, tot cu pensula umectată cu alcool 70° se ridică secțiunile și se cufundă într'un vas cu alcool 70°.

§ 437. — Secțiunile astfel obținute sunt apte pentru a fi prelucrate mai departe. Inainte de colorare sunt trecute prin apă distilată, în care sunt lăsate câteva minute (aceasta în cazul când colorantul este făcut cu apă distilată). Intrucât celoidina nu împiedică colorarea pieselor, nu vom căuta s'o îndepărtăm.

§ 438. — Cuțitele folosite pentru tăierea pieselor incluzionate în celoidină sunt cuțite lungi, cu o față plată și una concavă sau cu două fețe plane. In orice caz vom avea în vedere ca fața care privește piesa să fie totdeauna fața plană. In ceeace privește celelalte amănunte în legătură cu cuțitele, vezi capitolul respectiv.

439. — Includerea pieselor în colodiu (după Hagi Paraschiv-Bazgan) este foarte asemănătoare cu aceea în celoidină. Ea prezintă avantajul ușurinței de procurare a colodiului, acesta găsindu-se ca soluție gata preparată.

§ 440. — 1) Piesele din alcool absolut sunt trecute prin amestecuri de alcool-eter în proporții crescânde de eter, până se ajunge la alcool 1 parte, eter 4 părți. In fiecare lichid sau amestec se țin piesele 6—12 ore. 2) Se trec apoi printr'un amestec de colodiu 2 părți cu amestecul alcool-eter (1 : 4) 1 parte. In acest amestec se țin piesele 3—8 zile pentru a fi bine imbibate. 3) Se trec apoi piesele prin amestecuri în care proporția de colodiu crește treptat la 4 : 1 și apoi 5 : 1, pentru ca să se ajungă la soluția colodiu oficinal. 4) Se toarnă apoi piesele ca pentru celoidină și se întăresc în cloroform, ca pentru blocurile de celoidină.

INCLUDEREA ÎN GELATINĂ

§ 441. — Includerea în gelatină a fost recomandată pentru numeroase tehnici de colorare a pieselor care nu suportă nici includerea în celoidină sau parafină prin compoziția lor, nici secționarea la ghiață, din cauza friabilității lor.

Se folosește gelatină de cea mai bună calitate, de preferat gelatină foi. Se prepară din această gelatină trei soluții de concentrații crescânde, astfel: prima soluție 5%, a doua 12%, a treia 25%. Se adaugă la soluții 1% fenol. In ultima soluție de 25% gelatină se poate adăuga 10% glicerină, pentru a mări elasticitatea gelatinei. Prepararea soluțiilor se face la cald, la 37°.

Este recomandabil să se prepare soluțiile pe măsura necesităților, valoarea lor fiind de scurtă durată. Preferabil este să se schimbe soluțiile după fiecare includere. Soluțiile sunt ținute în borcane cu dop șlefuit, care să nu permită evaporarea apei.

§ 442. — *Includerea se face la cald*, într'un termostat de 37°.

Se procedează în felul următor: 1) după fixare, piesele sunt tăiate de mărimea dorită, cu o grosime cât mai mică; 2) se spală apoi la apă curgătoare timp de 18—24 de ore; 3) se trec apoi piesele în soluția 5% de gelatină în care sunt ținute 14—16 ore, apoi în soluție 12% 16—24 de ore și în soluție 25% în care sunt ținute 2—3 zile.

§ 443. — **Montarea pieselor și turnarea blocurilor.** Din ultima soluție de gelatină, piesele sunt trecute în vase mici, în care s'a turnat soluție de gelatină concentrată (25%). Se lasă astfel câtva timp, până începe să se întărească gelatina, apoi vasele se țin la rece. Indată ce gelatina s'a întărit se scot blocurile și se cufundă în formol 20% în care se lasă 3—6 ore pentru a se întări. Pot fi apoi păstrate într'o soluție de formol 10%.

§ 444. — Tăierea blocurilor de gelatină se face cu microtomul de ghiață. Blocurile trebue spălate timp de 20—30'. Apoi sunt fixate pe un dop de plută cu ajutorul unei soluții de gelatină și acid acetic (în părți egale) topită pe baie de apă, în alcool 95° în proporție de 1/2 față de greutatea precedentelor. Secționarea se face după lipirea directă a blocului pe port-obiectul microtomului.

§ 445. — Secțiunile obținute sunt trecute în apă, fiind prelucrate în continuare ca și secțiunile obținute prin secționarea la ghiață sau pot fi lipite pe lame.

§ 446. — Este foarte importantă îndepărtarea gelatinei din cupe, pentru o bună examinare microscopică a pieselor colorate; aceasta, întrucât gelatina se poate colora la rândul ei foarte intens.

Metodele de îndepărtare a gelatinei nu prea dau însă rezultate bune. Pentru îndepărtarea gelatinei se poate proceda astfel: cupele obținute din blocuri de gelatină formolizate se trec într'o soluție de

NaOH 10% timp de 30′ la temperatura de 37°. Apoi sunt spălate în apă curgătoare, după care se pot colora.

§ 447. — Intrucât secționarea blocurilor obținute prin includere în gelatină după metoda precedentă este foarte grea, blocurile fiind moi și după formolizare, se poate folosi următoarea modificare: utilizarea a trei soluții de gelatină, 12,5%, 25% și 50%. Piesele sunt trecute prin cele trei soluții, menținându-le în fiecare 24—36 de ore. Includerea se face la cald. Apoi piesele sunt trecute într'o nouă soluție 50% de gelatină, în care sunt ținute 15—30′ și se montează în soluție de gelatină 50%. După răcirea gelatinei ca mai sus se scot blocurile, care sunt suficient de tari. *Nu se mai trec prin formol.* Se taie la microtomul de ghiață. Blocurile trebue secționate cât mai rapid, ele putându-se păstra până în 1—2 săptămâni în borcane bine închise, la rece.

§ 448. — **Lipirea secțiunilor pe lame** (după Merculov). Pentru îndepărtarea gelatinei este necesar ca secțiunile să fie lipite pe lame. Pentru aceasta, lamele trebue să fie perfect curate. Ele se ung pe o față cu albumină Mayer. Apoi se întind secțiunile pe ele. Se usucă aplicând deasupra o hârtie de filtru uscată sau imbibată ușor cu alcool 96°. După uscarea cu hârtie de filtru, fără a ține cupele la aer, sunt trecute rapid în apă caldă (40°). Gelatina se topește și cupele pot fi colorate. Se va lucra cu multă atenție, pentrucă secțiunile se deslipesc foarte ușor. Merculov recomandă ca secțiunile colorate să fie montate cu oricare din procedee dacă gelatina a fost scoasă. Dacă nu, se vor monta cu glicerină sau cu un amestec de glicerină-gelatină părți egale.

INCLUDEREA ÎN CELOIDINĂ-PARAFINĂ

§ 449. — Pentru studiul histopatologic al organelor care nu pot fi supuse includerii în parafină, întrucât retracția consecutivă e prea importantă și totodată această metodă nu permite păstrarea raporturilor părților lor componente și nici includerea în celoidină nu satisface cercetarea, nepermițând studiul secțiunilor în serie și cu o grosime de câțiva microni, se poate folosi cu mult succes pentru aceste cazuri includerea în celoidină-parafină (de exemplu, ochiul).

§ 450. — Substanțele folosite sunt cele descrise la capitolele includerii în celoidină și în parafină.

§ 451. — Includerea se execută astfel: 1) după spălarea pieselor de fixator, acestea sunt supuse includerii în celoidină conform tehnicii indicate și turnate în blocuri de celoidină; 2) blocurile sunt întărite în cloroform, apoi 3) blocurile sunt cufundate chiar în cloroform, în care sunt ținute timp de 24—36 de ore, pentru a se imbiba bine. In acest fel blocurile (și deci și piesele incluse) se imbibă cu un lichid miscibil ca parafina; 4) se trec apoi blocurile în parafină caldă la 53—54° în care sunt ținute între 20—36 de ore, în funcție de mărimea blocului.

In acest timp blocul este imbibat cu parafină; 5) se scoate apoi blocul astfel imbibat și se montează în parafină sau se răcește ca atare. După răcire se constată că blocul a căpătat o consistență mărită, beneficiind totodată de avantajele includerii în celoidină (menținerea raporturilor foștilor componenți, etc.); 6) blocul astfel obținut poate fi secționat în serie; 7) tăierea pieselor astfel incluse se face în microtomul de parafină, ca pentru piesele incluse în parafină; 8) prelucrarea secțiunilor mai departe este aceeași ca pentru secțiunile pieselor incluse în parafină.

CUȚITELE DE MICROTOM

§ 452. — Cuțitele de microtom se prezintă ca lame de cuțit, de mărimi și forme diferite. Uneori ele prezintă un mic mâner sau o tijă metalică scurtă, care ușurează manipularea. Cuțitele de microtom sunt făcute din oțel.

§ 453. — Cuțitele variază după mărime. In general, cuțitele cele mai mari sunt cuțitele de celoidină, care, secționând blocurile oblic, au nevoie de un tăiș cât mai lung. Cuțitele mici servesc pentru secționarea pieselor la ghiață, iar pentru blocurile de parafină pot fi folosite cuțite de forme și mărimi diferite.

§ 454. — Se va observa că nu orice cuțit poate fi potrivit la orice microtom, întrucât lățimea muchiei sale poate depăși dimensiunile suportului de cuțit al microtomului. In general, cuțitele cu muchie groasă sunt cuțite de parafină.



Fig. 10. — Spate pentru ascuțit cuțitul.

§ 455.— Cuțitele diferă și după forma lor. Astfel se deosebesc cuțite cu amândouă fețele drepte — cuțite drepte; cuțite cu o față dreaptă și una concavă — cuțite mixte; și cuțite cu amândouă fețele concave—cuțite biconcave. Forma cuțitelor atrage și recomandarea lor în anume cazuri. Astfel, cuțitele drepte se folosesc în special pentru tăierea la ghiață și parafină, ele având o rezistență mai mare. Pentru tăierea blocurilor de parafină se folosesc și cuțitele dublu concave, care prezintă un unghi al tăișului foarte ascuțit, permițând astfel să se obțină cupe foarte subțiri. Ele vor fi folosite în special pentru blocurile care se taie ușor. Cuțitele cu o față concavă și una dreaptă sunt folosite în general pentru blocurile de celoidină. Totuși, folosirea lor este extinsă și pentru piesele incluse în parafină.

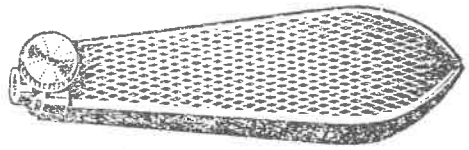


Fig. 11. — Mâner de cuțit.

§ 456. — Pentru alegerea cuțitului se va ține seama și de forma tăișului său, prin tăiș înțelegând întreaga porțiune ascuțită care taie și care prezintă muchea tăișului propriu zisă. De înălțimea tăișului depinde unghiul său și deci și ascuțimea muchiei sale. Astfel se disting trei feluri de tăișuri: *a)* unul înalt, cu un unghi foarte ascuțit, *b)* unul mediu, cu un unghi mai mare și *c)* unul scurt cu un unghi și mai mare.

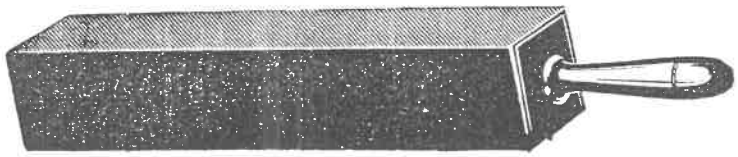


Fig. 12. — Curea cu patru fețe pentru ascuțit cuțitele de microtom.

Cuțitele cu tăișul înalt cu unghiul mic au muchea cea mai ascuțită, dar totodată cel mai ușor de tocit. Deaceea ele vor fi folosite numai la piese incluse în celoidină sau la piesele incluse în parafină dar cu o consistență scăzută. Aceste cuțite, ca și cele intermediare, au de obicei fețele biconcave sau cu o față concavă și una dreaptă.

Cuțitele cu tăișul scurt și deci cu un unghi mare, trebue folosite pentru piese cu o consistență mare, cum sunt piesele congelate sau pentru cele incluse în parafină și mai dure. Pentru piesele înghețate pot fi folosite însă și cuțitele intermediare. In concluzie, cu cât tăișul cuțitului are un unghi mai mic, cu atât cupele vor fi mai subțiri. Obișnuit, cuțitele au însemnată pe una din fețele lor litera corespunzătoare tăișului lor.

§ 457. — Dacă laboratorul este înzestrat numai cu cuțite de un singur tip, este totuși recomandabil să le separăm, folosind același sau aceleași cuțite pentru cutare sau cutare mod de tăiere. In acest fel întreținerea lor este ușurată.

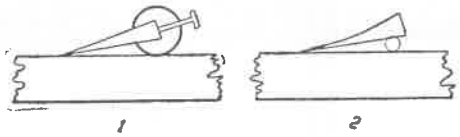


Fig. 13. — Poziția cuțitului pe piatra de ascuțit.

§ 458. — Pentru secționarea pieselor, cuțitului fixat la microtom i se va da totdeauna o anumită înclinare, reglată prin mișcarea suportului de cuțit al microtomului. Această înclinare rezultă din forma cuțitului, și anume din faptul că tăișul cuțitului cu lama lui formează un unghi. Vom urmări deaceea ca, prin apropierea blocului de cuțit, cuțitul să vină în contact cu acesta prin fața tăișului său. Dând o înclinare vicioasă se poate ca blocul să se lovească de colțul făcut de tăiș cu restul lamei microtomului. In acest caz nu se vor obține secțiuni corecte, întrucât blocul

vine în contact cu tăișul numai la 2 sau 3 înaintări, când el trece de marginea cuțitului. Secțiunile obținute vor fi astfel mult mai groase, iar blocul este lovit brutal și chiar rupt. Nu se recomandă nici depășirea înclinației în sens invers, întrucât în acest caz cuțitul scobește blocul. Reglarea unghiului de ascuțire depinde de unghiul clinului și de înclinația acestuia față de lama cuțitului, așa încât este potrivit dela caz la caz, prin observare și încercare.

§ 459. — O mare importanță pentru obținerea unor secțiuni netezi și subțiri este starea tăișului. Acesta nu trebue să prezinte știrbituri care determină pe cupe producerea de striații, uneori grosolane. Deasemenea, așa cum vom vedea mai jos, tăișul nu trebue să prezinte urme din «ața» lăsată de ascuțirea lui.

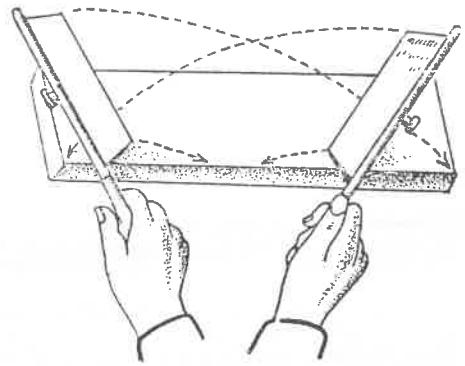


Fig. 14. — Mișcarea cuțitului pe piatra de ascuțit.

§ 460. — **Modul de ascuțire al cuțitelor.** Secționarea pieselor elastice, cum sunt cele incluse în celoidină sau colodiu, se face în unghi, cuțitul tăind piesa cu o mare întindere din tăișul său, evitând astfel turtirea ei. In aceste cazuri cuțitul acționează ca un brici, răzând cupa dela bloc. Secționarea pieselor incluse într'un mediu tare, cum este parafina, sau a pieselor înghețate, se face prin proiectarea perpendiculară a cuțitului față de piesa respectivă. In aceste cazuri cuțitul acționează ca o pană, desprinzând cupa din piesă.

§ 461. — **Ascuțirea cuțitelor.** Vom atrage atenția dela început că prin metodele folosite în laborator pentru ascuțirea cuțitelor nu pot fi corectate decât defectele reduse ale tăișului lor. In momentul când se produc știrbituri care interesează tot tăișul, cuțitul va fi îndreptat către ateliere speciale, care vor corecta defectele formându-i un nou tăiș.

§ 462. — Cuțitele vor trebui ascuțite după fiecare folosire a lor, întrucât, prin secționare, tăișul lor se poate recurba ușor, să se toceasca sau să se știrbească, accidente care creează apoi dificultăți de tăiere. Prin ascuțire urmărim să corijăm aceste accidente. Pentru aceasta vom căuta să ridicăm mai întâi un strat subțire de oțel, rectificând astfel forma fațetelor tăișului, netezindu-le apoi cât este posibil.

§ 463. — In mod curent cuțitele sunt ascuțite succesiv pe piatră și apoi pe curea. O bună ascuțire necesită însă studierea formei lor, întrucât cu piatra sau cureaua trebue să vină în contact fațetele tăi-

şului lor. Deaceea cuţitul cu feţele drepte va trebui ridicat la nivelul muchiei sale groase, de o parte şi alta. Pentru aceasta se vor folosi jghiaburi cilindrice în care este introdusă muchea groasă a cuţitului, aşa încât, culcat, cuţitul să capete înclinarea necesară. Cuţitele cu muchea groasă şi cu feţele concave, prin simpla culcare pe piatră sau curea vin în contact la nivelul faţetelor tăişului cu acestea. In cecace priveşte cuţitele cu o faţă dreaptă şi una concavă, vor trebui ridicate numai pe faţa dreaptă. Pentru aceasta se vor folosi jghiaburi triunghiulare, în care introducem muchea groasă a cuţitului, astfel încât curbura jghiabului să fie în dreptul feţei drepte, iar faţa netedă a jghiabului în dreptul feţei concave a cuţitului. Aceste jghiaburi-spătar vor trebui potrivite pentru fiecare cuţit, aşa încât să nu fie nici prea înalte, nici prea joase. Merculov recomandă ca fiecare cuţit să aibă jghiabul-spătar propriu, folosit numai la ascuţirea lui. Unele jghiaburi sunt prevăzute cu mici şuruburi prin înşurubarea cărora ele se fixează mai bine la muchea cuţitului. Unele cuţite sunt prevăzute cu o tijă scurtă la care se poate fixa un mâner, uşurând manipularea lor în timpul ascuţitului.

§ 464. — Ascuţirea pe piatră asigură îndepărtarea ştirbiturilor mici şi formarea unei muchii ascuţite a tăişului rotunjit.

In acest scop sunt folosite pietre cu grăunţe foarte fine, bine cimentate, uniforme. Piatra trebue să aibă duritatea oţelului. Pietrele grosolane, cu grăunţe mari, nu pot crea un tăiş uniform neted. Pietrele cele mai bune sunt piatra albă şi piatra uşor gălbuie, care întrunesc toate condiţiile de mai sus. Pietrele vor fi suficient de late (minimum 4 cm) şi pe cât posibil drepte.

§ 465. — Cuţitele nu vor fi ascuţite pe piatră uscată, ci suprafaţa acesteia trebue umectată. In acest scop se foloseşte un ulei cum este uleiul de vaselină, untdelemnul, etc. sau apă cu săpun (numai partea spumoasă care nu conţine grunji tari). Folosirea unui umectant mai gros favorizează o ascuţire mai fină. Pietrele unse cu un ulei trebue ferite de praf şi şterse înainte de întrebuinţare. Când piatra a fost umectată cu apă sau apă cu săpun, ea va fi bine ştearsă după folosire.

§ 466. — Ascuţirea pe piatră se face plimbând cuţitul culcat, cu tăişul tot timpul înainte, în contact cu piatra. Cuţitul va fi aşezat pe piatră la început cu muchea sa sau cu jghiabul suport şi apoi, lent, vom aplica şi tăişul. Apoi el înaintează cu tăişul înainte, făcând un unghi cu axul longitudinal al pietrei, astfel ca, plecând cu o extremitate a cuţitului, să ajungem la celălalt capăt al pietrei cu cealaltă extremitate. In permanenţă muchea şi tăişul vor veni în contact cu toată suprafaţa pietrei, nefiind permis să se ridice niciun moment în niciun punct. Cuţitul va fi lăsat uşor pe piatră, ascuţindu-se sub greutatea sa proprie. Ajungând la celălalt capăt al pietrei, cuţitul este întors, răsucindu-l tot timpul cu tăişul în sus. Apoi el este plimbat pe piatră în sens invers, cu tăişul tot timpul înainte.

Cuţitul este ascuţit făcându-se 30—40 de plimbări pe o faţă şi alta a sa. Se va observa ca aceste plimbări pe piatră să se facă în toate sensurile, pentrucă în acest fel ascuţirea este mai bună.

Ascuţirea pe piatră este oprită când, controlând cu un mijloc optic de mărire, constatăm că la tăiş s'a format o «aţă» fină grunjoasă, şi când cuţitul nu mai prezintă ştirbituri. Odată ce aţa aceasta s'a format este inutil să continuăm întrucât ascuţirea nu mai beneficiază, iar aţa aceasta elastică nu se desprinde pe piatră, ci numai pe curea.

§ 467. — Ascuţirea pe curea asigură îndepărtarea aţei tăişului formată pe piatră şi ajută la ascuţirea cuţitului uşor tocit. Ea nu rezolvă ştirbiturile tăişului.

In acest scop se folosesc curele speciale, care se prezintă sub două forme. Cureaua cu patru feţe: o faţă este piatra, o faţă neagră cu grunji mari, o faţă roşie cu grunji mijlocii şi o faţă neagră foarte fină. Feţele cu grunji mai mari servesc şi pentru ridicarea aţei tăişului, aşa încât cuţitul va fi tras întâi pe faţa neagră cu grunji mari, apoi pe cea roşie şi la urmă pe faţa neagră cu grunji fini.

Se mai găsesc curele cu două feţe. Una mai aspră serveşte pentru îndepărtarea aţei, deaceea cuţitul va fi tras pe această faţă întâi; cealaltă faţă serveşte pentru ascuţirea cuţitului. Feţele curelei trebue unse cu paste speciale. Cu pastă roşie se va unge cureaua roşie, cu celelalte feţele corespunzătoare.

Polisajul definitiv trebue făcut însă pe o curea neunsă cu pastă, întrucât pasta, datorită grunjilor pe care îi conţine, serveşte să îndepărteze asperităţile tăişului, ca şi piatra. Tot din această cauză, când se trece cuţitul dela o curea la alta, el trebue bine şters.

Acţiunea curelei rezultă din elasticitatea şi constituţia sa.

§ 468. — Pentru ascuţirea cuţitului pe curea se culcă pe aceasta cu muchea groasă (prevăzută deasemenea cu jghiabul suport) înainte. Apoi cuţitul alunecă cu muchea groasă înainte într'un sens şi în celălalt pe o faţă. Este întors după aceasta şi tras pe faţa cealaltă, deasemenea în amândouă sensurile, cu muchea groasă înainte. Ca şi pentru ascuţirea pe piatră, cuţitul merge oblic, aşa ca, parcurgând lungimea curelei, el să vină totodată în contact cu cureaua dela un capăt la celălalt.

Nu se va apăsa cu prea multă putere cuţitul pe curea. După trecerea cuţitului pe fiecare curea de 40—60 ori, «aţa» cuţitului trebue să dispară, feţele tăişului să fie netede, iar tăişul perfect ascuţit.

§ 469. — Ingrijirea microtoamelor şi cuţitelor. După efectuarea secţiunilor necesare, microtoamele şi cuţitele trebue gospodărite. Aceasta constă în curăţirea lor de urmele de substanţe sau resturi din piesele sau blocurile respective.

§ 470. — Microtomul este curăţat numai după ce s'a scos cuţitul. El este şters cu cârpe moi, aşa fel însă încât să nu se demonteze sistemul lui micrometric, care cere cunoştinţe de specialitate spre a fi demontat.

§ 471. — Dacă alunecarea diferitelor piese ale microtomului se face cu greutate, se picură, la nivelul respectiv, câteva picături de ulei de os sau ulei de vaselină în lipsa primului. Părțile lui componente trebue să alunece ușor și liber în timpul lucrului. După curățirea și la nevoie ungerea lui, microtomul este șters cu puțin gaz sau benzină.

§ 472. — La microtomul de ghiață se observă starea de curățenie a măsuței la care este fixat și a pieselor care îl înconjoară și pe care se poate depune apă. După lucru microtoamele trebue totdeauna acoperite.

§ 473. — Cuțitele microtomului vor fi bine curățite după întrebuințare de resturile de pe ele și șterse uscat cu cârpe moi. La nevoie se pot șterge cu puțin benzen sau benzină ușoară. In timpul ștergerii cuțitelor, nu vom atinge tăișul lor. Cuțitele de microtom nu trebue lăsate niciun moment pe masă. Ele trebue păstrate în cutii speciale, în care stau perfect fixate. Cuțitele care nu sunt folosite un timp mai îndelungat vor fi unse cu un strat subțire de vaselină neutră.

COLORAREA ȘI COLORANȚII

§ 474. — Tehnica histologică modernă își datorește în mare parte progresul producerii unei serii întregi de coloranți sintetici, din ce în ce mai electivi și mai specifici. In mare parte grație lor, histochimia devine astăzi avangarda histopatologiei, mijlocul cel mai important de cunoaștere a substratului morfologic al modificărilor funcționale; acestea din urmă erau până de curând greu decelabile cu finețe de grosolanele metode de colorare histologice. Dacă însă toate aceste metode au permis și permit progresul histopatologiei, nu trebue totuși insistat prea mult asupra importanței lor, pentrucă progresul histologiei nu a mers în acelaș pas cu numărul enorm de coloranți sintetizați. Coloratiile sunt departe de a fi totul în histologie și în histopatologie și primul rol al microscopistului nu este de a fi un bun « vopsitor », ci de a ști să privească în microscop, de a înțelege modificările observate în comparație cu cele normale, de a le lega de aspectul clinic al bolnavului.

§ 475. — Coloratia este o metodă necesară, dar încă insuficientă. Ea este necesară mai ales datorită faptului că imaginile din preparatele colorate produse prin absorbție sunt mult mai ușor de interpretat decât imaginile de difracție date de preparatele necolorate. Este drept că metoda examinării pe fond întunecat la ultramicroscop sau la ultropac, ca și microscopia prin contrast de faze sau în ultraviolet au lărgit limitele actuale ale cunoașterii noastre, totuși rezultatele obținute, considerate izolat, nu spun mai mult decât coloratiile privite în acelaș mod; de unde necesitatea colaborării tuturor acestor metode în studiul histopatologiei.

364

Pe de altă parte, unii coloranți posedă o afinitate particulară pentru anumite elemente ale țesuturilor, și până la un punct aceștia pot fi comparați cu reactivii chimici, ei stând la baza analizei cromatice și histochimice a țesuturilor normale și patologice.

§ 476. — Substratul coloratiei țesuturilor este încă incomplect cunoscut. In unele cazuri, puține de altfel, există siguranța unei reacții chimice. In marea majoritate a cazurilor par să se producă fenomene fizico-chimice, în care difuzibilitatea și concentrația colorantului pe de o parte și porozitatea structurală a țesuturilor pe de altă parte sunt principalii factori. Se disting două tipuri de coloratie: prin penetrare și prin precipitare.

§ 477. — **Colorarea prin penetrare** are la bază pătrunderea soluției colorante în toate structurile. Acest tip de coloratie pare să fie specific coloranților acizi, în timp ce coloranții bazici dau și al doilea tip de coloratie. In cazul coloranților acizi — și parțial și al celor bazici — intensitatea coloratiilor produse de soluții echimoleculare, măsurată colorimetric, scade cu diminuarea gradului de dispersie al soluției colorante.

§ 478. — **Colorarea prin precipitare** este un fenomen de suprafață care se petrece numai în anumite condiții structurale. Ea are la bază floculareа colorantului bazic, care la suprafața acestor structuri se opune coloizilor acizi. Intensitatea coloratiei prin precipitare variază invers proporțional cu concentrația soluției colorante în timp ce, pentru unii coloranți (albastru de metilen, roșu neutru), crește concentrația. Tipurile de coloratie prin precipitare sunt metodele pentru nuclei, granulațiile mastocitelor, cartilaj, mucus, coloratiile care folosesc mordanți.

§ 479. — In ambele tipuri de coloratie, prin penetrare și prin precipitare, intervine într'o măsură importantă și adsorbția colorantului pe structurile histologice.

§ 480. — Fără nicio îndoială că un factor important este și încărcarea electrică, atât a colorantului, cât și a substratului. Acesta din urmă este influențat și modificat de fixare (vezi § 184). Măsura în care această încărcare electrică are la bază structuri electrolitice sau neionizabile depinde foarte probabil de fiecare țesut și colorant în parte.

§ 481. — Un factor important care apare ca rezultat al coloratiilor și de care trebue să se țină neapărat seama în critica fiecărei metode este gradul în care aceasta creează structuri artificiale.

§ 482. — **Metodele de colorare** au la bază afinitatea electivă a colorantului pentru anumite țesuturi. Coloratiile *difuze* nu au nicio întrebuințare în microscopie. Cele *elective* pot fi mai mult sau mai puțin *specifice*, ele sunt folosite ca atare. Unii coloranți necesită o prealabilă *mordansare* — coloratia este denumită în acest caz *indirectă*. Modul de a conduce coloratia diferențiază deasemenea *coloratii progresive* și *regresive*. Unii coloranți, în prezența unor anumite structuri

tisulare își modifică culoarea, realizând *metacromazia*. In fine, există colorații simple și combinate, colorații simultane, panoptice, în massă. Acestea din urmă, mult mai puțin întrebuințate astăzi, sunt posibile numai cu soluții colorante penetrante ca hemateina și carminul. Ele nu au finețea colorațiilor pe secțiuni, ceeace este un impediment față de ieftinătatea lor, colorațiile în massă făcând posibilă montarea secțiunilor după deparafinare, fără utilizarea alcoolului. Această metodă este însă folosită frecvent în materie de impregnații (vezi mai departe).

§ 483. — **Metacromazia** este fenomenul prin care, după colorare, țesutul apare colorat altfel decât soluția colorantă. Acest fenomen a fost explicat prin punerea în libertate a bazei colorate, care prezintă un alt spectru de absorbție decât sarea colorată. După alții, ar fi vorba de deplasarea unui echilibru între două forme tautomere, care există în orice soluție; echilibrul se deplasează în favoarea tautomerului metacromatic.

Substanțele cromotrope capabile să deplaseze acest echilibru sunt mai ales esterii sulfurici, ca cei din acidul condroitinsulfuric.

Se colorează metacromatic — în funcție de colorant — cartilajul, amiloidul, tigroida, etc.

§ 484. — **Metodele de colorație progresivă** folosesc coloranți slabi care acționează vreme îndelungată asupra țesuturilor, așa încât în momentul scoaterii secțiunilor din colorant acestea au colorația definitivă ca tonalitate și intensitate. Aceste procedee sunt dintre cele care permit cel mai sigur folosirea afinității tinctoriale a țesuturilor. Se folosesc mai ales coloranții acizi de anilină, hematoxilină (în mare parte) și carminul. Cele mai bune soluții sunt cele care au cel mai puțin tendința să supracoloreze, sau să coloreze și alte structuri. Singurul inconvenient al acestui tip de colorație este dificultatea de a stabili limitele exacte ale colorației tuturor elementelor similare din aceeași secțiune, adică de a asigura uniformitatea colorației.

§ 485. — **Metodele regresive** utilizează o supracolorare a secțiunilor care sunt decolorate apoi treptat într'un disolvant apropiat, diferențiatorul. Acest al doilea timp este în practică o decolorare progresivă și selectivă, denumită *diferențiere*. Ca să dea rezultate bune, metodele regresive trebue să fie utilizate numai pe secțiuni foarte subțiri și de grosimi egale, care ușurează extracția colorantului. Cei mai buni coloranți pentru metodele regresive sunt hematoxilina și coloranții bazici care se pretează bine diferențierii. Se utilizează de cele mai multe ori soluții diluate care favorizează disocierea colorantului și fixarea sa în țesuturi. Diferențierea trebue făcută încet, altfel rezultatele sunt inegale.

§ 486. — **Influența fixării asupra colorației.** Se susține de multe ori că cei mai mulți fixatori nu împiedică sau favorizează anumite colorații. Fixarea este necesară nu numai pentru oprirea evoluției proceselor interne din țesuturi, dar și pentru durabilitatea colorației ulterioare. Colorațiile sunt influențate în genere de resturile de acizi din piesele fixate și insuficient spălate, de urmele de iod, sau chiar de precipitatele rezultate prin fixare (sublimat, bicromat, acid cromic) care nu au fost îndepărtate. Resturile de acid picric influențează astfel colorațiile cu hematoxilină, formolul nu favorizează tricromul Masson, etc.

§ 487. — Un fapt care trebue discutat cu privire la influența fixării asupra colorației este cel al modificărilor histochimice determinate în țesuturi de actul fixării. Toți fixatorii folosiți curent în histologie și histopatologie sunt acizi. Este greu de admis că încărcarea electrică diferită a diverselor organite celulare și componente tisulare, încărcare diferită și variabilă în timp, care stă la baza activității fiziologice însăși, să nu fie influențată și modificată de prezența unui mediu acid care acționează îndelungat, precipită, coagulează miceliile coloidale și chiar schimbă structura chimică a polipeptidelor. Ca atare, afinitatea tinctorială inițială, extrem de slabă pentru marea majoritate a coloranților, devine puternică, se diferențiază, apar elemente și organite celulare acidofile sau bazofile. Structura chimică inițială a acestora este influențată variabil; astfel, unele componente ajung să se coloreze la neutralitate, iar altele la pH-uri mai mult sau mai puțin acide, așa încât stabilirea cu ajutorul coloranților a încărcării electrice și deci a pH-ului propriu al țesuturilor se referă la ultimul echilibru al acestora, și anume cel rezultat după fixare. Nu se poate spune deci că un organit este acid sau bazic, fiindcă are afinitate pentru un colorant bazic sau acid, ci că numai după fixare a căpătat aceste caractere.

§ 488. — **Mordansarea** este o operație intermediară între fixare și colorare, care o pregătește pe aceasta din urmă. Mordanții par să provoace o combinație chimică între două substanțe care inițial nu au nicio afinitate chimică, una pentru cealaltă. Ei sensibilizează într'un mod oarecare țesutul, realizând cu el o combinație stabilă și exaltându-i electivitatea. Mordanții pot produce cu coloranții respectivi precipitate puternic colorate și insolubile în apă. In esență, între țesut, mordant și colorant se produce o triplă combinație colorată, suficient de stabilă pentru a rezista între anumite limite agenților decoloranți.

§ 489. — Mordanții nu pot forma cu proteinele combinații stabile decât precipitându-le. Astfel, mare parte dintre fixatori, cei cromici în special, mordansează odată cu fixarea, așa încât colorațiile care par directe sunt în realitate indirecte. Mordanții se folosesc fie acționând asupra țesuturilor fixate, fie amestecați în prealabil cu colorantul, cu care formează *lacuri*.

§ 490. — In histologie se folosesc mordanți neutri sau acizi. Ei nu au o afinitate bazică pentru țesuturi, ci una oxipolară, mordanții oxidanți având o acțiune reductoare asupra țesuturilor. Importanța acestui tip de mordansare se datorește mai ales faptului că puterea reductoare a țesuturilor este principala piedică în colorarea lor. Asupra

acesteia acționează, anihilând-o în mare parte, fixatorii oxidanți și în egală măsură mordanții.

§ 491. — Mordanții folosiți în microscopie sunt de mai multe tipuri: oxidanți metalici (acizi cromic, osmic, fosfomolibdic, azotic, clorurile de platină, zinc, mercur), metaloizii (bromul, acidul bromhidric, iodul), oxidanții organici (acidul picric, anilina, fenolul, formolul). Alaunii manifestă o puternică acțiune mordantă. Cei mai folosiți sunt alaunii de potasiu $(SO_4)_2AlK$ și de fier și amoniu $(SO_4)_2FeNH_4$. Taninul este un mordant întrebuințat în impregnările argentice. Dintre mordanții bazici, folosiți în genere mai puțin, se utilizează hidroxidul de potasiu, boratul de sodiu, piridina, etc.

COLORANȚII

§ 492. — Colorantul este o substanță care posedă proprietatea de a exercita asupra luminii o absorbție electivă și de a comunica această proprietate altor corpuri în combinație cu ele. Colorația nu este astfel decât un caz particular al fenomenului general al absorbției selective, care se exercită atât asupra radiațiilor vizibile ale spectrului solar, cât și asupra celor invizibile. Structura moleculară a combinației colorant-substrat nu este totdeauna identică cu cea a colorantului, de unde rezultă metacromazia.

§ 493. — Coloranții sunt etichetați de obicei acizi și bazici. In realitate, un colorant bazic este o substanță organică, formată dintr'o bază colorată sau din sarea acesteia, iar un colorant acid este fie un acid colorat, fie sarea colorată a acestuia, legate și într'un caz și într'altul de un radical incolor.

Substanțele organice colorate din seria aromatică, care nu posedă grupe salifiabile, nu colorează, nu transmit proprietatea lor de absorbții selectivă altor corpuri. Aceste substanțe se numesc *cromogene*. Radicalii fixați pe cromogeni, denumiți *cromofori*, reprezintă substratul proprietății colorante. Dintre cromoforii bazici, cei mai importanți sunt: grupa amino (NH_2-), derivatele mono- și dimetilamino (CH_3NH- și $(CH_3)_2N$-), grupa imino (NH-). Cromoforii acizi cei mai importanți sunt: hidroxilul (-OH), carboxilul (-COOH), grupa nitro ($-NO_2$) și grupa sulfonică ($-SO_2OH$).

Cromogenul cu cromoforul bazic formează un colorant bazic, cromogenul cu cromoforul acid formează un colorant acid.

Cu cât numărul cromoforilor fixați pe cromogen este mai mare, cu atât mai puternică este capacitatea de colorare. Alături de aceste grupe cromofore există altele, în general nesaturate, denumite *auxocrome*, care introduse în molecula unui cromogen îi modifică spectrul de absorbție, intensificându-i culoarea și puterea de colorare.

Pe unii cromogeni se găsesc fixați uneori atât cromofori acizi, cât și bazici; asemenea coloranți sunt amfoteri. In fine, unii cromogeni pot fixa cromofori indiferenți, adică nici acizi, nici bazici ($-OCH_3$, $-OC_2H_5$, -O), formând coloranți indiferenți.

§ 494. — Clasificarea coloranților stabilește grupe de coloranți simpli și compuși, naturali și sintetici.

§ 495. — **Coloranții compuși** sunt amfoteri. Cei mai utilizați sunt eozinații de albastru de metilen și de azur de metilen, picratul de verde de metil, picratul de verde de metilen, verdele Janus (derivat azoic al safraninei).

§ 496. — **Coloranții simpli artificiali**, după structura chimică, sunt de mai multe tipuri:

a) Cu cromofor *nitro* ($-NO_2$): *acidul picric* (trinitrofenol), *aurantia* (hexanitrofenilamina); *galben victoria* (sarea de sodiu a dinitrocrezolului), etc.

b) Cu cromofor *azoic* (– N=N–) *monoazoicii* cei mai utilizați sunt: *crisoidina* (diamidoazobenzen), *vezuvina* (triamidoazobenzen), *verdele Janus* (diazină). Dintre *oxiazoici* se folosesc: *ponceau R*, sau *ponceau de xilidină* (derivat al acidului betanaftoldisulfonic), *galbenul metanil* (sarea de sodiu a acidului metaamidobenzensulfonic), etc. Dintre *tetrazoici* se folosesc: *sudanul III* și *scharlachul R*, coloranți importanți ai grăsimilor, derivații benzidinei, ca: *roșul de Congo*, *roșul tripan*, *benzopurpurina*, etc.

c) Cu cromofor *oxichinonic* se folosesc *alizarina* (antrachinona) și derivații ei, *purpurina* (trioxiantrachinonă), *verdele de antracen*.

d) Cu cromofor *chinonimidic*. Din acest grup fac parte *azinele* (roșul neutru, safraninele), *tiazinele* (*tionina*, *albastrul de toluidină*, *albastrul de metilen*, *azurul de metilen*), *oxazinele* (*albastrul de Nil*, *albastrul de crezil*, *violetul de crezil*) și *indulinele* (*nigrozina*).

e) Coloranții fenilmetanici cuprind difenilmetanii, dintre care cel mai important este *pironina*, și trifenilmetanii, dintre care cei mai utilizați în histopatologie sunt *fuxina bazică* și *fuxina acidă*, *rubinul bazic* și *rubinul acid*, *violetul de metil*, *violetul cristal* și *violetul de gențiană*, *verdele de metil*, *verdele malachit*, *verdele lumină*, *albastrul de anilină* hidro- și alcoolosolubil, *albastrul de metil*, etc. Tot din grupul coloranților trifenilmetanici fac parte derivații ftaleinei: *eozina* și *eritrozina*, *safraninele*, *floxinele*, cu derivații săi azoici.

§ 497. — **Coloranții simpli naturali** conțin cromofori cetonici. Cei mai utilizați în histopatologie sunt: *hematoxilina*, *carminul*, *indigocarminul*, *orceina*, etc.

§ 498. — Colorațiile se fac în general în soluții apoase sau alcoolice de colorant, acide, neutre sau alcaline. Secțiunile se trec în prealabil prin apă, apă distilată sau alcool. După colorare, spălarea surplusului de colorant se face de obicei tot cu apă, mai rar cu apă distilată, apă acidulată sau alcool, după solubilitatea colorantului.

§ 499. — După unele colorații este necesară fixarea colorantului pe preparat. Aceasta se face în cazuri speciale cu molibdat de amoniu, picrat de amoniu sau tanin.

IMPREGNĂRILE METALICE

§ 500. — Nu toate componentele țesuturilor pot fi puse în evidență cu ajutorul coloranților. Unii componenți tisulari devin aparenți numai după precipitarea la nivelul lor a unei cantități de metal redus. Metalul este pus în contact cu țesutul în cauză, fixat în prealabil, sub forma unei soluții saline. Reducerea acesteia se face în parte sub acțiunea puterii reducătoare proprii a țesutului, în parte sub acțiunea substanțelor reducătoare sau a agenților fizici, ca lumina. Substanțele cele mai utilizate pentru impregnarea țesuturilor sunt argintul, aurul, osmiul.

§ 501. — Impregnațiile sunt utilizate ca metode curente în studiul sistemului nervos, al endoteliilor, al componentelor fibrilare ale conjunctivului.

§ 502. — In general, impregnările se produc lent. Ele necesită adesea fixări speciale, dar mai ales îndepărtarea minuțioasă a fixatorului înainte de impregnare. In multe metode se folosesc mordansări sau sensibilizări anterioare impregnării cu soluția salină metalică. Acestea grăbesc de obicei durata impregnării.

§ 503. — Reușita impregnării este condiționată pe de altă parte de curățenia lamelor, a vaselor, a baghetelor și pipetelor utilizate, ca și de puritatea reactivilor.

Sticlăria întrebuințată pentru impregnări nu trebue să aibă și alte utilizări. Ea trebue să fie în permanență curată. Aceasta se obține prin tratarea sticlăriei cu amestec sulfocromic, prin spălare cu apă din abundență și apoi prin clătirea cu apă distilată. După întrebuințare, sticlăria trebue imediat curățită și spălată cu apă distilată. Secțiunile nelipite pe lame se transportă numai cu baghete sau ace de sticlă.

Puritatea chimicalelor întrebuințate este o condiție absolută a reușitei impregnării. Cantitățile scoase în exces din ambalajele originale nu vor mai fi introduse la loc. Apa trebue să fie distilată și redistilată într'un aparat în întregime din sticlă, fără părți sau dopuri de cauciuc. Inainte de întrebuințare apa va fi încercată cu nitrat de argint, care trebue să se disolve și soluția să rămână absolut clară (să nu se formeze clorură de argint albă).

MONTAREA SECȚIUNILOR COLORATE

§ 504. — După colorare, secțiunile imbibate de apă nu se pretează la o examinare microscopică din cauza aspectului lor turbure. Pentru ca să poată fi studiate elementele secțiunii, pentru a se clarifica complect

secțiunile, permițând străbaterea lor de razele luminoase, este necesar deshidratarea lor și apoi montarea lor între lamă și lamelă.

§ 505. — Pentru deshidratare se folosesc diferite procedee, în funcție de metoda de colorație, de metoda de includere și în funcție de necesitatea de a păstra în aceeași stare secțiunile colorate.

§ 506. — Pentru secțiunile obținute la ghiață și colorate cu metodele uzuale de diagnostic (hemalaun-eozină) se procedează în felul următor: după colorare (în sticle de ceasornic), secțiunile se trec în alcool 96° apoi în alcool absolut, în care sunt lăsate câteva minute (nu prea mult pentrucă scoate colorantul). De aici sunt trecute în creozot, timp de două-trei minute. Se poate observa cum secțiunile răsucite și opace în alcool se întind perfect și se clarifică după cele câteva minute de menținere în creozot. Mai departe ele se pot trece în xilen, spre a fi spălate de excesul de creozot. Din xilen sau chiar direct din creozot, cu ajutorul unei spatule și a acului de sticlă, secțiunile sunt întinse pe lamă. Pentru a ușura întinderea, lama va fi așezată pe cristalizoare mici. Odată cu secțiunea respectivă se vor picura pe lamă și câteva picături din lichidul clarificator. Intindem cu acul acest lichid pe lamă, ușurând astfel alunecarea secțiunii și întinderea ei. Se absoarbe tot excesul de lichid de pe lamă cu ajutorul unei hârtii de filtru.

Peste secțiunea astfel întinsă se pun 1—2 picături de balsam de Canada. Este necesară o soluție mai fluidă de balsam de Canada pentrucă, adăugând apoi lamela deasupra, soluția aceasta se întinde mai ușor și piesa nu se desface.

După aplicarea lamelei se apasă în centrul acesteia cu vârful unei pense, cu o presiune foarte mică, spre a nu rupe secțiunea, care este în general foarte fragilă.

§ 507. — Pentru secțiunile făcute la ghiață și colorate cu metodele pentru grăsimi sau lipoizi, vom modifica tehnica de montare, întrucât, folosind reactivi ca xilenul, benzenul sau toluenul, etc., disolvăm și grăsimile sau lipoizii respectivi.

In acest caz, montarea secțiunilor colorate se face cu sirop Apathy, cu lichidul lui Kasarinoff, sau cu glicerină.

§ 508. — *Siropul Apathy* are următoarea compoziție: zahăr cristale, gumă arabică și apă distilată, în părți egale. Preparare: se pune guma arabică într'un săculeț de tifon și se cufundă în apa distilată (jumătate din cantitatea totală). Se lasă la baie de apă până se disolvă. Pe de altă parte se disolvă zahărul în cealaltă jumătate din cantitatea de apă distilată. Se amestecă apoi bine cele două lichide, până ce amestecul devine perfect omogen. Se adaugă apoi fie 1 cc de formol, fie câteva cristale de timol, pentru a împiedica desvoltarea bacteriilor și fermentarea.

Se filtrează apoi la cald și se păstrează într'un vas bine închis.

§ 509. — *Montarea în sirop Apathy*: după colorarea secțiunilor în coloranți pentru grăsimi sau lipoizi și diferențiere, acestea sunt trecute

rapid prin apă distilată. Acest moment se dovedeşte necesar, întrucât atât coloranţii, cât şi diferenţiatorii sunt în acest caz alcoolici, iar în prezenţa alcoolului în cantitate mare, zahărul din sirop se poate cristaliza, stricând preparatul. Din apă distilată, secţiunile sunt apoi întinse pe lame, cu ajutorul unei spatule şi cu acul.

După întinderea secţiunii se picură pe ea 1—2 picături de sirop, în raport cu mărimea secţiunii. Se aplică lamela deasupra şi se apasă cu atenţie spre a nu rupe piesa.

Dacă se formează bule de aer se ciocăneşte uşor cu coada acului de sticlă în lamelă, determinând ieşirea bulelor de aer, rând pe rând.

§ 510. — In aceleaşi condiţii şi cu aceleaşi rezultate se poate folosi siropul lui Kasarinoff, care se compune din: gumă arabică 50 g, zahăr cristale 20 g, apă distilată 50 cc, formol 0,5 cc. Se topeşte totul la 55°. Se filtrează la cald.

§ 511. — *Montarea în glicerină.* După colorare şi diferenţiere, secţiunile sunt trecute din alcool prin apă distilată, timp foarte scurt, pentru a opri astfel şi diferenţierea. Apoi sunt întinse pe lamă cu o spatulă şi cu acul de sticlă. Se picură două picături de glicerină pe piesă şi se aplică apoi lamele. Se apasă uşor şi eventual se scot bulele de aer. Lamela se lipeşte apoi cu parafină pe margini.

Montarea în glicerină nu conservă decât colorațiile cu hematoxilină, cu carmin şi scharlach R sau sudan.

Se poate ca, în loc să se picure balsamul, siropul Apathy sau glicerina pe piesă, să se pună o picătură-două pe lamelă, lăsând apoi ca aceasta să cadă cu faţa pe secţiunea întinsă pe lamă. Se apasă apoi uşor şi se scot bulele. Această metodă se pretează însă la formarea a mult mai numeroase bule decât tehnica indicată mai sus.

§ 512. — *Montarea secţiunilor lipite pe lamă (includere în parafină) şi apoi colorate* se face întrucâtva diferit, toate operaţiile făcându-se pe lamă şi permiţând astfel o prelucrare mai minuţioasă. Cele mai utilizate metode folosesc balsamul de Canada neutru, balsamul de Canada acid, uleiul de cedru.

§ 513. — *Montarea cu balsam de Canada* neutru necesită în prealabil o bună deshidratare şi clarificare a secţiunilor. Deshidratarea se face cu alcool 96°, apoi cu alcool absolut. Fiecare alcool este lăsat să acţioneze asupra secţiunilor timp de câteva minute. Se va observa ca secţiunile să nu fie ţinute în alcooluri prea mult timp, întrucât acesta deseori disolvă coloranţii acizi de pe secţiune.

§ 514. — Clarificarea se face în doi timpi: 1) In primul timp se foloseşte xilen, benzen sau toluen fenolat 10—20%. In felul acesta sunt scoase din secţiuni şi ultimele urme de apă. Se vor ţine în acest lichid clarificator până ce secţiunile devin perfect transparente. Pentru acest timp al clarificării se poate folosi cu succes şi creozotul, dar, fiind mai greu de procurat, noi preferăm lichidele celelalte. 2) In timpul doi se foloseşte xilen, toluen sau benzen curat. Lamele sunt spălate cu

unul din aceste lichide câteva secunde. Apoi se picură pe secţiunea astfel clarificată una-două picături de balsam de Canada neutru. Se aplică apoi lamela, atent, spre a nu se forma bule de aer. Acestea pot fi scoase prin ciocănirea foarte uşoară a lamelei sau apăsarea ei. Se va lucra cu atenţie spre a nu sparge lamela.

§ 515. — Dacă în momentul când secţiunile sunt puse în contact cu al doilea lichid clarificator (xilen, benzen, toluen) se observă formarea de nori fini albicioşi, atunci se redeshidratează secţiunile în alcool, apoi se clarifică din nou cu unul din lichidele indicate.

Dacă după adăugarea balsamului şi aplicarea lamelei se observă că secţiunea este opalescentă, lamelele sunt demontate cu xilen, sunt spălate bine de balsam tot cu xilen şi se reia apoi dela început întreaga operaţie a deshidratării, clarificării şi montării în balsam.

§ 516. — Pentru practică, este preferabil ca toate lichidele folosite în scopul deshidratării şi clarificării să fie turnate pe lame (pe secţiuni). Lamele sunt aşezate orizontal pe cristalizoare mici. Este preferabil ca pentru fiecare timp lama să fie trecută pe un anumit cristalizor. De exemplu, pe un cristalizor se trece lama pe care este alcool 96°, pe altul lama cu alcool absolut, etc.

In lipsă de materiale suficiente, şi numai în acest caz, se pot folosi băi de alcool, xilen fenolat sau oricare altul din lichidele indicate. Folosirea acestora trebue să fie limitată la acest caz, pentrucă în general, în băi, deshidratarea şi clarificarea nu reuşesc a fi de cea mai bună calitate, ca urmare a unei rapide impurificări a lichidelor respective.

§ 517. — După montarea lor în balsam, înainte de a fi închise în cutii, lamele sunt lăsate descoperite la aer una-două zile, spre a se usca balsamul cât mai bine, fixând temeinic lamele.

§ 518. — După colorații cu fuxină acidă, ponceau sau verde lumină, dacă sunt montate în balsam de Canada neutru, secţiunile pierd cu timpul, şi în mare măsură, culorile. Pentru a preîntâmpina aceasta, montarea va folosi balsam de Canada acidulat, care păstrează mai bine culorile în aceste cazuri, mediul acid favorizând fixarea coloranţilor pe secţiune.

§ 519. — Balsamul acid se prepară adăugând acid salicilic la balsamul diluat. In prealabil, secţiunile sunt tratate câteva secunde cu xilen salicilic.

§ 520. — Montarea în balsam oxidat se foloseşte pentru cupele colorate cu coloranţi albaştri bazici. Pentru aceasta, pe secţiunile colorate se pun câteva picături de balsam, şi se lasă în contact cu aerul câteva ore, ferindu-le de praf. Montarea în balsam oxidat permite o mult mai bună păstrare a colorațiilor indicate.

§ 521. — Dacă balsamul de Canada s'a uscat sau s'a îngroşat prea mult, el poate fi diluat cu o cantitate potrivită de xilen, benzen sau toluen.

Dacă după montarea lamelei se constată că sub lamelă este o cantitate insuficientă de balsam (ulei de cedru sau amestec de colofoniu)

şi apar bule mari de aer, se adaugă câteva picături de balsam pe lamă în imediata vecinătate a lamelei. Apoi, cu vârful unui ac, balsamul este apropiat de lamelă, pe care se ciocăneşte uşor. Prin capilaritate, balsamul intră sub lamelă.

§ 522. — In cazul când sunt necesare obţinerea şi păstrarea cât mai bună a claritătii unui preparat microscopic, îndeosebi pentru examinările cu imersie, se poate folosi pentru montare uleiul de cedru. Dominici recomandă ca montarea cu ulei de cedru să se facă după colorarea secţiunilor cu substanţe bazice de anilină, ca: Giemsa, toluidină, tionină, policrom Unna, etc., ca şi după colorarea preparatelor după metoda Nissl.

Deshidratarea şi clarificarea se execută la fel ca pentru metodele care folcsesc balsam de Canada.

Lamele astfel montate se vor manipula foarte atent, întrucât uleiul de cedru se usucă mai greu decât balsamul, lamela deslipindu-se foarte uşor. Pentru a se usca cât mai bine, lamele sunt lăsate câteva zile descoperite şi întinse pe o placă de carton sau lemn. Se va folosi ulei de cedru cât mai gros.

§ 523. — In lipsa balsamului de Canada, acesta poate fi înlocuit cu rezultate foarte bune, folosind următorul amestec: colofoniu 150 g, xilen 300 g. După disolvarea colofoniului în xilen, se adaugă un vârf de lingură de cărbune animal pentru purificarea preparatului. Se filtrează pe hârtie de filtru. Se lasă apoi într'un borcan perfect curat, legat la gură cu un tifon gros; în acest fel o parte din xilen se evaporează, amestecul îngroşându-se puţin. In momentul când amestecul a ajuns la o consistenţă uşor siropoasă, borcanul este acoperit cât mai bine cu un dop şi păstrat la întuneric (lumina face ca amestecul să se închidă la culoare).

§ 524. — *Uneori, în special în scopul de a păstra pentru un timp îndelungat culoarea secţiunilor, acestea sunt montate într'un amestec de gelatină.* Reproducem după Hagi-Paraschiv-Bazgan procedeul respectiv: se iau 20 g foi de gelatină, se fragmentează şi se pun într'un vas Erlenmeyer împreună cu 100 cc apă distilată. Se lasă totul la 52° timp de 24—48 de ore. In acest interval gelatina s'a macerat şi pentru a omogeniza amestecul se scutură timp de 10—20 de minute.

Se filtrează prin hârtie de filtru, la aceeaşi temperatură şi se lasă la termostat 12—24 de ore.

Pentru ca gelatina să nu se altereze se adaugă câteva cristale de timol sau acid fenic cristalizat, sau acid salicilic, sau 5 cc formol din comerţ, apoi se agită bine şi se lasă la rece spre a se solidifica.

Inainte de întrebuinţare se încălzeşte la baie de apă, până ce se lichefiază sau se ţine în etuvă la 52°.

Montarea secţiunilor trebue făcută pe lame care au stat la cald. După ce am întins preparatele se pun cu o baghetă de sticlă una-două

picături de gelatină, punând deasupra o lamelă încălzită. Lamela este lăsată să cadă cu încetul, pentru a evita formarea bulelor de aer.

Metoda montării în gelatină poate fi aplicată atât pentru montarea secţiunilor tăiate la ghiaţă, cât şi pentru cele lipite pe lamă.

§ 525. — Preparatele păstrate timp foarte îndelungat, în urma uscării substanţei cu care au fost montate, suferă modificări atât în ceeace priveşte culoarea, cât şi prin formarea bulelor de aer sub lamelă şi uscarea lor în acest fel.

Pentru a evita acest inconvenient, cu urmări foarte neplăcute pentru colecţiile de lame, se pot folosi mai multe metode.

Astfel, la montarea secţiunilor se poate folosi un balsam de Canada mai gros. Se vor adăuga mai multe picături din acest balsam, în aşa fel încât pe marginea lamelei aplicate să rămână o ramă de 2—3 mm de balsam. Această metodă reuşeşte în cele mai multe cazuri cu condiţia neapărată însă de a se folosi dela început un balsam mai gros. Totuşi, metoda nu este perfect sigură.

§ 526. — **Păstrarea preparatelor** este mai sigură dacă, după montarea lamelei cu balsam de Canada, ulei de cedru, etc., se parafinează marginile lamelei. Parafina topită se picură în aşa fel încât să acopere în mod continuu o ramă subţire din lamelă şi să se întindă pe 2—3 mm în jurul acesteia. Pentru ca parafina să adere bine de sticlă, este necesar ca mediul cu care s'a făcut montarea să fie cât mai bine uscat (fără să se fi făcut bule de aer), iar sticla să fie perfect curată.

§ 527. — Pentru perfecta lipire a lamelei se poate folosi un amestec de colofoniu 3 părţi, ceară de albine 7 părţi şi seu 1 parte. Se topesc şi se amestecă bine. Cimentul astfel format este luat pe vârful unei spatule încălzite şi aplicat pe marginile lamelei într'un strat continuu.

§ 528. — *Secţiunile pieselor incluse în celoidină* se tratează mai departe fără să fie lipite, celoidina împiedicând distrugerea piesei. Secţiunile sunt adunate în alcool 70%, din care se trec prin alcool de 50 % în apă. Preparatele fixate în sublimat trebue iodate şi apoi scos iodul şi tratate ca la tehnica din § 226.

§ 529. — Când celoidina trebue îndepărtată fiind prea colorată, secţiunile se lipesc pe lamă după metodele indicate (§ 178). Indepărtarea celoidinei se face prin tratarea lamelor pe care sunt întinse secţiunile cu alcool-eter în părţi egale, acetonă sau alcool metilic.

§ 530. — Montarea secţiunilor de celoidină lipite pe lamă şi de pe care celoidina a fost îndepărtată se face la fel ca pentru secţiunile dela parafină.

§ 531. — Secţiunile de celoidină în care celoidina nu trebue îndepărtată se trec în alcool propilic anhidru. Din el se trec în xilen. Montare. In loc de alcool propilic se poate folosi alcool butilic şi izobutilic.

§ 532. — Montarea secţiunilor de celoidină nelipite se face în modul următor: după colorare, preparatele sunt luate cu beţişoare de sticlă din apă şi trecute în alcool de 70%, întinzându-le bine. Se trec

apoi pe o lamă, se întind şi se usucă cu hârtie de filtru. Se picură apoi alcool 96% pe secţiuni şi se lasă câteva minute. Se varsă apoi alcoolul şi se picură deasupra xilen fenolat (10 p. xilen — 1 p. fenol), lăsându-l câteva minute. Se reînnoieşte xilenul feniolat. Se spală bine cu xilen curat, de două ori. Se montează cu balsam.

§ 533. — **Finisajul lamelor.** După montarea secţiunilor sau lipirea lor, lamele trebue bine curăţite de balsam, parafină sau alte resturi şi impurităţi de pe ele, cu puţin xilen curat, dar numai după ce s'au uscat perfect.

Apoi, către unul din capetele lamei se aplică o etichetă dreptunghiulară pe care se notează datele în legătură cu piesa respectivă, coloraţia executată, fixatorul folosit, ca şi data executării coloraţiei.

METODELE DE RECONSTRUCŢIE

§ 534. — Reconstrucţia este operaţia prin care căpătăm informaţii asupra întinderii şi formei în spaţiu a unei piese pe care am debitat-o în secţiuni pentru examenul microscopic.

§ 535. — Asemenea informaţii pot fi căpătate fie prin construirea unui model în spaţiu, deci în trei dimensiuni, din ceară, negocol, rominit, plastilină, carton sau placaj, fie prin obţinerea unui desen pe hârtie, în două dimensiuni.

In primul caz vorbim de o reconstrucţie plastică, în al doilea de o reconstrucţie grafică. Atât una cât şi cealaltă se obţin prin suprapunerea secţiunilor microscopice, seriate.

PREGĂTIREA PIESEI PENTRU RECONSTRUCŢIE

§ 536. — Indiferent de felul reconstrucţiei (plastică sau grafică), secţiunile seriate care servesc pentru reconstrucţie nu trebue să aibă lacune, rupturi sau falduri şi nu trebue să fie tasate. Din acest din urmă considerent, nu vom face secţiuni prea subţiri.

§ 537. — *Modelul reconstruit* se obţine prin suprapunerea corectă a secţiunilor. Pentru a obţine o asemenea suprapunere corectă trebue să folosim neapărat repere exterioare piesei de reconstruit, aşa numite linii sau contururi directoare.

§ 538. — **Reperele interioare**, aparţinând însuşi obiectului reconstruit, folosite pentru suprapunere, dau rezultate mai slabe. Nici distanţele, nici unghiurile nu pot fi păstrate corect, nici chiar într'o mică măsură.

§ 539. — Putem folosi ca reper aşa numita «linie directoare». Ea se obţine în modul următor: placa de sticlă pe care se include piesa în parafină poartă o serie de şanţuri rectilinii şi paralele între ele, aşezate la intervale neregulate (placa *Born-Peter*). Barele pentru incluzie,

şi ele de sticlă, se aşează pe placă, astfel încât delimitează împreună un spaţiu de forma unui paralelipiped dreptunghiular, ale cărui muchii de lungime sunt paralele cu şanţurile plăcii. Piesa de inclus ajunge astfel negreşit în imediata apropiere a plăcii şănţuite. Pe de altă parte, blocul de parafină paralelipipedic care rezultă din incluzie prezintă pe una din feţele lui (aceea de lângă piesă) o serie de reliefuri rectiliniare şi paralele, care reproduc în pozitiv şanţurile săpate în negativ pe placa Born-Peter. Pentru a le face lesne de recunoscut şi după debitarea blocului pe secţiuni, faţa cu dungi trebue înnegrită. Innegrirea aceasta este o operaţie delicată. Rezultate bune se obţin prin arderea unui cristal de camfor şi prinderea fumului pe o placă rece. Cu o pensulă muiată în soluţie de şerlac, se ridică fumul de pe placă şi se vopseşte faţa cu dungi a blocului de parafină, fără a încărca prea mult această faţă (culoarea nu trebue să fie neagră, ci numai cenuşie). Blocul trebue atacat de microtom just *perpendicular pe faţa cu dungi*. După tăierea secţiunilor, în locul feţei cu dungi vom avea o linie dreaptă care poartă din loc în loc, în mod neregulat, câte un accident, reprezentând dunga în relief secţionată. Această linie este tocmai «*linia directoare*». Prin suprapunerea liniilor directoare din diferite secţiuni, se suprapune automat şi piesa de reconstruit.

§ 540. — In locul liniei directoare, dificilă de realizat, putem întrebuinţa cu bune rezultate *bare cilindrice directoare*, alcătuite dintr'un ţesut oarecare, de preferinţă ficat. Pentru a le obţine, pregătim ficatul ca pentru o incluzie obişnuită. Apoi, în ultima parafină, cu ajutorul unui trocar pentru puncţie, încălzit la termostat, scoatem două fragmente cilindrice de ţesut hepatic. Pe acestea le aşezăm în parafină, pe placa de sticlă care serveşte pentru incluzie. Fragmentele cilindrice de ţesut hepatic trebue aşezate paralele între ele. In acest scop facem două urme rectilinii şi paralele pe placa de sticlă cu diamantul şi aşezăm cilindrii de ţesut hepatic just în dreptul lor. După ce aceşti cilindri s'au solidarizat cu fundul preparatului printr'un început de solidificare a parafinei la fund, introducem şi piesa de reconstruit. Secţionăm blocul perpendicular pe faţa din dreptul cilindrilor hepatici. Chiar dacă normalitatea n'ar fi complect asigurată, reconstrucţia corectă este totuşi posibilă.

Forma eliptică a secţiunii ne informează asupra decalajului care trebue realizat la suprapunere.

Prin secţionarea cu microtomul, cilindrii hepatici sunt transformaţi în contururi circulare, care prin suprapunerea lor realizează automat şi suprapunerea piesei.

§ 541. — Această din urmă tehnică poate fi realizată şi pe incluziile la celoidină şi gelatină.

§ 542. — Un alt mijloc de suprapunere a secţiunilor pentru reconstrucţia embrionilor este cel propus de Scharer: mărim profilul embrionului (trecut prin băile de parafină) de exact acelaş număr de ori

cât este necesar pentru reconstrucție. Secționăm apoi piesa în plan transversal, astfel ca să nu existe abateri notabile dela simetria bilaterală a secțiunilor. Pe fiecare secțiune determinăm apoi linia mediană și o așezăm în «patronul» închipuit de profilul de mai dinainte fixat al embrionului. Formațiunea de reconstruit se suprapune automat în poziție corectă prin integrarea liniilor mediane în «patronul» profilului. Pentru a putea realiza în bune condiții această integrare, este necesar să pornim dela un punct lesne de reperat, pe profil; unul din aceste puncte este de pildă nivelul superior sau inferior al pătrunderii cordonului ombilical.

METODELE DE RECONSTRUCȚIE GRAFICĂ

RECONSTRUCȚIILE PROIECTIVE

§ 543. — Plecând dela secțiunea planului de tăiere al blocului, putem obține cu ușurință diverse alte secțiuni perpendiculare pe acel plan, prin metode grafice. Intr'adevăr, pe figura dată din planul de tăiere al blocului se poate trage o linie dreaptă (planul nou de secțiune) pe care o prelungim până într'un punct anumit al liniei directoare. Reproducem linia, reprezentând planul nou de secțiune pe toate figurile seriei, pornind din același punct al liniei directoare și închizând cu același unghi. Avem astfel pentru toate figurile trei puncte: unul constant, pe linia directoare, alte două reprezentând intersecția liniei noi cu figura.

Pe o hârtie liniată orizontal, în care intervalul liniilor reprezintă grosimea secțiunilor mărită la scara reproducerii, tragem într'un capăt al ei o linie verticală, dreaptă. Această linie reprezintă intersecția planului director cu noul plan de secțiune, care la rândul lui este reprezentat de chiar planul hârtiei pe care facem reconstrucția «proiectivă». Punctul constant de pe linia directoare se înșirue acum în lungul verticalei trase. Pentru fiecare secțiune așezăm apoi celelalte două puncte, reprezentând intersecția liniei noi cu figura, pe câte o linie orizontală, la distanțele cuvenite de linia verticală. Distanțele acestea le luăm din desenul pregătitor mai sus arătat; am văzut că în acest desen figurează cele trei puncte și — evident — distanțele corecte dintre ele.

§ 544. — In loc de a prelungi linia care reprezintă planul nou de secțiune, până la linia directoare, lucru greu de realizat practic în cazul unor unghiuri mici între cele două direcții, putem îndoi linia nouă într'un unghi oarecare, pentru a fixa punctul de întâlnire cu linia directoare în limitele desenului. In toate desenele ulterioare, acest unghi și linia ajutătoare trebue reproduse întocmai.

§ 545. — Tot atât de simplu se poate face «reconstrucția proiectivă» după un plan perpendicular pe planul director, dar incluzând

cu planul după care am secționat blocul de parafină un unghi oarecare. Complicația unică ce avem de înfruntat în acest caz este deplasarea liniei de secțiune noi cu o dimensiune mereu egală pe linia directoare, din secțiune în secțiune. Această deplasare este egală cu grosimea secțiunii la scara reproducerii de înmulțit cu cos α.

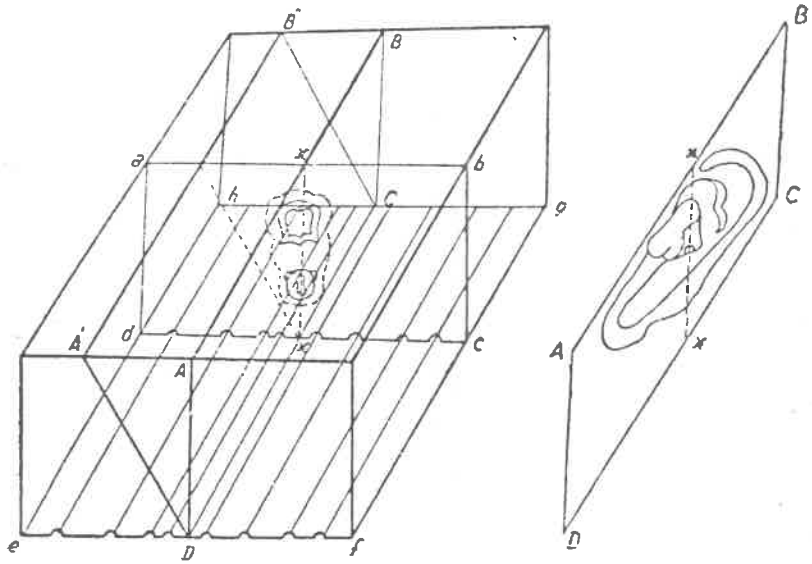


Fig. 15. — arată schematic situația unei reconstrucții grafice «proiective». Planul director este planul *efgh*, planul de secțiune, perpendicular pe planul director, este *abcd* și toate planurile paralele cu acesta. Reconstrucția după tehnica indicată ne dă imaginea din planul *ABCD*, perpendicular atât pe planul director, cât și pe planurile de secțiune. Cu aceeași tehnică putem obține imaginea din planul *A'B'CD* înclinat pe planul director, dar încă perpendicular pe planul de secțiune. Linia *CD* după care planurile, în care facem reconstrucția taie planul director este paralelă cu dungile din planul director *efgh*. In medalion reconstrucția grafică din planul *ABCD* reprezintă sistemul nervos al unui șoarece de 2,2 mm.

Deasemenea, pe hârtia liniată orizontal, intervalele nu sunt pur și simplu egale cu grosimea secțiunilor mărită la scara reproducerii, ci cu această grosime împărțită la sin α. In rest procedeul este ca și la § 543.

§ 546. — Mult mai complicată se prezintă «reconstrucția proiectivă» în cazul când planul nou de secțiune face unghiuri oarecare, atât în planul în care am secționat blocul, cât și în planul director. Fie α unghiul cuprins între «reconstrucția proiectivă» (planul nou de secțiune) și planul după care am secționat blocul. In fiecare figură, intersecția acestor

două planuri este o dreaptă, care cuprinde un unghi constant cu linia directoare, pe care îl vom numi β. Odată stabilită linia 1 pentru una din figuri, celelalte linii din figurile următoare se obţin prin deplasare pe linia directoare, de fiecare dată cu o cantitate (p), egală cu grosimea secţiunii la scara reproducerii de înmulţit cu $\frac{\cos\alpha}{\sin\beta}$ sau în simbolica algebrică:

$$p = \frac{\cos\alpha}{g \sin\beta}$$

Odată trase toate liniile acestea, putem începe reconstrucţia proiectivă după normele indicate la § 543. Linia dela care vom începe reconstrucţia nu mai este însă verticală, ci închide cu orizontalele un unghi ω, determinat de formula:

$$\cos\omega = \frac{\cos\alpha \cdot \cos\beta}{\sqrt{1-\sin^2\alpha\cos^2\beta}}$$

Distanţa dintre orizontale este $g/\sin\alpha$, adică grosimea secţiunii mărită la scara reproducţiei de împărţit cu sin α.

§ 547. — Este de multe ori important să stabilim unghiul pe care-l fac secţiunile noastre cu un plan de referinţă anume, de exemplu cu planul sagital pentru secţiunile care prezintă o oarecare deviere din acest plan. Interesul acestei probleme este evident atunci când ne gândim la cele expuse în paragrafele precedente; din secţiuni cu inclinaţie faţă de planul sagital, noi am putea reconstrui grafic o secţiune sagitală mediană, dacă am şti unghiul celor două planuri, sau mai bine — în lumina celor expuse la § 546 — o linie de intersecţie a planului sagital median căutat cu vreuna din figurile noastre şi în plus unghiul.

Pentru aflarea unghiului recomandăm procedeul lui *Lebedchin*, care ne dă totodată şi o intersecţie din cele cerute pentru a aplica metoda expusă la § 546. Din cauza oblicităţii secţiunilor faţă de planul median, de exemplu, puncte diferite din acest plan sunt aşezate în secţiuni diferite. Asemenea puncte diferite sunt: epifiza, hipofiza (punga lui Rathke), apeductul lui Sylvius, septul nasului, etc. Septul nasului dă cu planul de secţiune chiar o dungă dreaptă, şi ne arată astfel pe secţiune care este intersecţia planului median cu planul nostru de secţiune. Dacă avem această intersecţie la dispoziţie, calculul unghiului nu prezintă dificultăţi. Intr'adevăr, după ce căutăm un alt punct median (de exemplu, epifiza) şi suprapunem corect secţiunile cu ajutorul liniei directoare, coborîm din acest al doilea punct o perpendiculară pe intersecţia planului nostru de secţiune cu planul median, pe care o avem deja. Dacă lungimea acestei perpendiculare este 1, şi dela un punct de reper (septul nasului în cazul nostru) la celălalt punct de reper (epifiza în cazul nostru) există un număr de secţiuni intermediare pe care-l vom simboliza prin n, atunci unghiul dintre cele două planuri

este: $\sin = \frac{ng}{l}$ unde g este grosimea unei singure secţiuni mărită la scara reproducţiei.

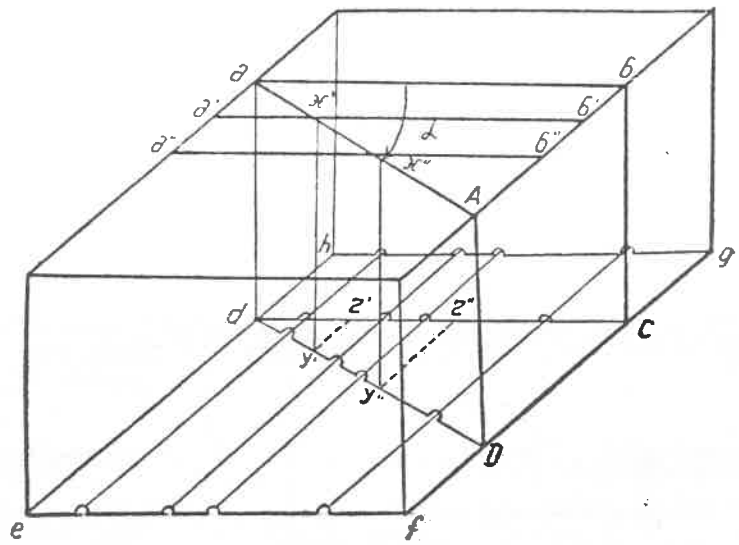
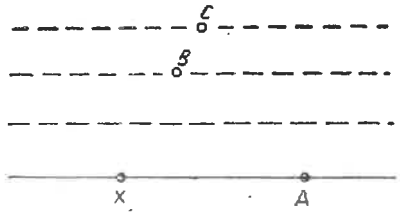


Fig. 16. — Cazul reconstrucţiei, după tehnica indicată. Planul în care reconstruim, *aAdD* este perpendicular pe planul director (*efgh*), dar închide cu planul de secţiune *abcd* unghiul x. Dacă aa', $a'a''$, etc., reprezintă grosimea secţiunilor, se vede pe figură cum liniile noi de intersecţie ale planului în care reconstruim cu planele de secţiune succesive (*ab*, *a'b'*, *a''b''*, etc.), linii pe care le-am notat cu *ad* $x'y'$, $x''y''$, etc., se găsesc cu piciorul lor în planul de secţiune succesiv în punctele *d*, *z*, *z'*, etc., astfel că $z'y'$ (grosimea cupei) $x \cos a = dz'$ (deplasarea pe dunga directoare). Figura reconstruită reproduce întocmai situaţia din planul *aAdD* (acesta este doar planul în care reconstruim). Deaceea distanţa între liniile orizontale va fi tocmai $dy' = y'y'' \ldots$; dar $dy' = y'z'$ (grosimea cupei): sin a.

§ 548. — Dacă însă nu avem o intersecţie, ne-o putem construi cu ajutorul mai multor puncte izolate din planul median:



Dacă punctul A se găseşte în prima secţiune, punctul B după două secţiuni şi punctul C după trei secţiuni, reunim B cu C pe proiecţia în două dimensiuni şi prelungim această distanţă BC de două ori pe direcţia ei până în punctul X. Unim A cu X, şi dreapta AX va fi tocmai intersecţia căutată. Dacă B şi C erau distante cu două secţiuni, atunci prelungeam o sigură dată distanţa BC pentru a-l afla pe X, iar dacă B şi C erau distante cu trei secţiuni, atunci împărţeam distanţa BC în trei părţi egale şi o prelungeam cu numai două din aceste trei părţi, pentru a-l afla pe X. Exemplul de mai sus poate fi lesne întrebuinţat de cititor ca ghid. In mod mai general putem spune că dacă distanţa

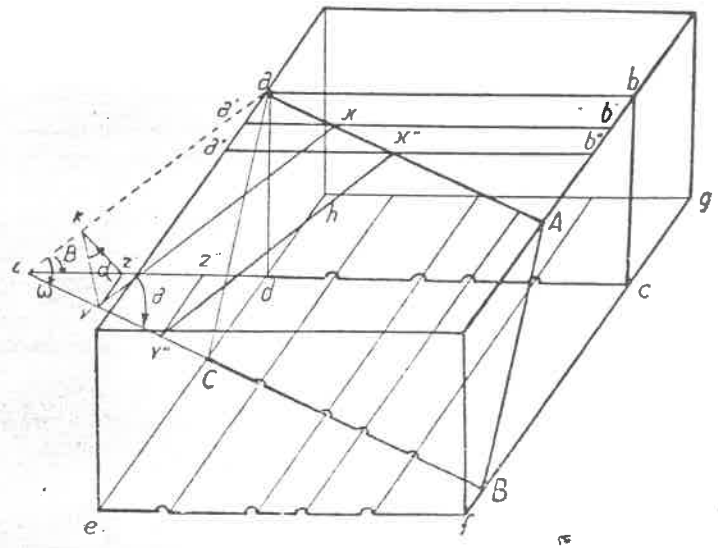


Fig. 17. — Ca şi în figurile precedente, *abcd* este planul de secţiune, *efgh*, planul director. Planul în care reconstruim, *aABC*, este înclinat atât pe planul director, cât şi pe planul de secţiune *abcd*, cu care face unghiul *diedru a*. Linia de intersecţie a planului după care reconstruim (*aABC*) cu planul în care am secţionat (*abcd*) este *ai*. Această linie de intersecţie face cu linia directoare din planul de sectiune (*cd*, unghiul *ia* cu linia directoare a planului în care reconstruim (*aABC*) unghiul *a*. Secţiunile succesive trec prin *ab*, *a'b'*, *a''b''*, ... astfel ca $aa' = a'a'' = \ldots$ grosimea secţiunii. Deplasarea pe linia directoare a liniei de intersecţie (*ai*, *x'y'*, etc.) în planul de secţiune dela o secţiune la alta este $iz' = z'z'' = \ldots$, care se proiectează pe linia directoare a planului de reconstrucţie după lungimile $uy' = y'y'' = \ldots$. Dacă avem în vedere că planul *ky'z'* este perpendicular pe linia de intersecţie *ai*, şi că pe de altă parte — pentru ratiuni de construcţie — *y'z'* este perpendicular pe planul *abcd* cu toate prelungirile ce rezultă:

$$\overline{i'z'} = \overline{kz'} \times \frac{1}{\sin \beta} \text{ şi } \overline{kz'} = \overline{y'z'} \times \cos \alpha, \text{ de unde}$$

$\overline{iz'}$ (decalajul pe linia directoare) = $\overline{y'z'}$ (grosimea cupei la scară) $\times \frac{\cos \alpha}{\sin \beta}$.
Pe de altă parte trigonometria sferică ne învaţă că:

$$\cos \omega = \frac{\cos \alpha . \cos \beta}{1 - \sin^2 . \alpha \cos^2 \beta}$$

Distanţa verticală dintre orizontalele reconstrucţiei *ai*, *x'y'*, *x''y''* ... este *ky'*. Din triunghiul dreptunghic *ky'x'* cu unghiul drept în *z'*, rezultă imediat: *ky'* (distanţa orizontalelor) = *y'z'* (grosimea cupei): sin.

dintre A şi B este de n secţiuni, iar dintre B şi C de m secţiuni, dividem segmentul BC în m părţi, iar în prelungirea lui spre A aşezăm n asemenea părţi în continuare. Extremitatea segmentului de dreaptă astfel determinat este tocmai punctul X.

Pentru aflarea unghiului procedăm ca la § 547.

§ 549. — Toate calculele cu linii trigonometrice dela § 545—548 pot fi înlocuite prin construcţii geometrice cu ajutorul cărora putem afla unghiurile date în acele paragrafe. Dată fiind grosimea mică a secţiunilor faţă de celelalte dimensiuni care intră în construcţii, metoda geometrică dă erori grosolane dacă nu este mânuită cu extremă conştiinciozitate. Deaceea recomandăm metoda calculului.

Procedeul izolării grafice

§ 550. — Izolarea grafică îşi propune să ne dea o vedere de ansamblu a unui organ reconstruit prin mijlocirea desenului.

In general este vorba de proiecţii ortogonale, care se obţin prin simpla suprapunere a secţiunilor, ţinând seama de linia directoare. In felul acesta se obţine un model pe care relieful este indicat prin contururi care se învelesc unul pe altul, asemănător întrucâtva cu liniile de nivel pe hartă. Metoda izolării grafice este imperfectă, căci nu ne dă vederea obiectului reconstruit în proiecţia obişnuită a ochiului sau aparatului fotografic, care este o proiecţie conică. Este imperfectă deasemenea pentrucă nu permite o măsurare directă a lungimilor şi a unghiurilor. Cu toate imperfecţiile sale, poate fi întrebuinţată în general cu folos, iar în ce priveşte reconstrucţiile de vase şi nervi sau alte organe asemănătoare care nu pot fi bine redate prin reconstrucţia plastică din cauza subţirimii şi multiplicităţii lor, este chiar unica metodă indicată.

§ 551. — S'au recomandat metode de a obţine vederi sub unghiuri noi dintr'o proiecţie ortogonală ca cea dela § 550. De exemplu, în locul normei laterale, o normă frontală. Toate procedeele recomandate pornesc dela ideea că deformând proiectiv secţiunile, sub unghiul de care este nevoie (de exemplu, de 90° în cazul transformării normei laterale într'una frontală), vom obţine prin suprapunerea cu decalaj a proiecţiilor deformate perspectiva nouă de care este nevoie. Deca-

lajul depinde de unghiul ales şi este de $g \cos \alpha$, g fiind grosimea secţiunilor dela care am plecat şi α unghiul ales. Imaginea obţinută nu este însă echivalentă cu cea dată de proiecţia ortogonală, a cărei tehnică am amănunţit-o la § 5 0. Relieful dispare în realitate în noua «izolare grafică», lucru care este cu deosebire evident în exemplul de mai sus. Intr'adevăr, suprapunerea corectă a secţiunilor sagitale ne-a dat o reliefată normă laterală. Dar proiectarea acestor secţiuni pe planul frontal nu dă decât nişte muchii, late cât grosimea secţiunilor, a căror alăturare dă numai informaţii asupra conturului în vedere frontală, dar nicio informaţie asupra reliefului. Această observaţie rămâne valabilă şi pentru unghiuri de proiecţie intermediare. Deaceea propunem părăsirea «izolărilor grafice» obţinute prin deformarea proiectivă a secţiunilor iniţiale.

§ 552. — Izolări grafice în altă vedere decât cea impusă de conducerea secţiunii blocului de parafină nu pot fi obţinute decât transformând toate secţiunile acestea după metoda indicată la § 546. Vederea nouă obţinută este perpendiculară pe planul de secţiune nou ales. Transformarea secţiunilor iniţiale este o operaţie migăloasă şi însoţită de mare pierdere de vreme. Indicaţiile vor fi excepţionale chiar în domeniul vaselor şi nervilor, care este domeniul propriu al reconstrucţiilor grafice.

Pentru a transforma secţiunile extindem metoda indicată la § 546 asupra seriei întregi. Este avantajos ca în noua serie de secţiuni transformată să păstrăm aceeaşi grosime de secţiune ca şi în seria iniţială, care a servit ca punct de plecare. In acest caz putem descompune fiecare secţiune iniţială într'o serie de fâşii despărţite de drepte paralele între ele şi tăind linia directoare la intervale egale cu p (§ 546). Unghiul ω se determină ca la § 546, iar suprapunerea secţiunilor nou obţinute se realizează cu un decalaj al noilor linii directoare egal cu $g/t\ gb$, unde b este dat de relaţia: $\cos b = \cos \beta \sin \alpha$. deci

$$g/tgb = g \frac{\sin \alpha \cos \beta}{1 - \sin^2 \alpha \cos^2 \beta}$$ (notaţiile sunt cele dela § 546).

RECONSTRUCŢIILE PLASTICE

§ 553. — Reconstrucţiile plastice ne dau înfăţişarea în trei dimensiuni a obiectului de reconstruit. Indicaţiile lor sunt foarte largi şi — după cum am văzut — izolările grafice nu trăiesc decât din puţinele contraindicaţii ale reconstrucţiilor plastice.

§ 554. — Reconstrucţiile plastice se realizează clasic din ceară. Aparatura necesară pentru reconstrucţiile în ceară poate fi improvizată. Un mare desavantaj al metodei constă în aceea că trebue lucrat la cald.

Se pot obţine plăci de ceară de grosime egală, lucrând cu ceară muiată prin căldură şi punând ceara apoi într'un soi de tăviţă cu fundul absolut drept (o piatră litografică poate servi în acest scop)

şi cu marginile late, de înălţimea plăcii care trebue confecţionată. Cu un sucitor metalic perfect cilindric, ceva mai lung decât tăviţa descrisă mai sus, se turteşte şi se egalizează placa de ceară. După răcire şi întărire, placa se decupează după desen, cu ajutorul unui cuţit ascuţit şi bine încălzit, după tehnica clasică, decupând totodată şi linia directoare.

Din această cauză suntem siliţi să legăm piesa de reconstruit cu linia directoare prin punţi de ceară, adesea complicate. Nu vom putea evita punţile cu nicio metodă, dar vom putea simplifica modelul, dacă vom aşeza puncte de suprapunere chiar în interiorul piesei, aşa cum a propus Lebedchin. In general, două puncte sunt suficiente. Prin punctele acestea trec două andrele rezistente şi se înşirue plăcile una după alta. In acest timp procedăm la solidarizarea plăcilor de ceară prin badijonarea feţelor de contact cu esenţă de terebentină. După aceea putem modela suprafaţa reconstrucţiei, care iniţial are forma de trepte, întrucât la microscop am reprodus totdeauna conturul maxim al secţiunilor. Cu o spatulă caldă vom scoate prin urmare treptele şi vom netezi preparatul.

§ 555. — Rezultate asemănătoare se pot obţine şi cu plăci netede de placaj, pe care se copiază şi se decupează desenele cu ferestrăul de traforaj. Suprapunerea se realizează ca la § 551 prin puncte interioare, iar solidarizarea plăcilor decupate se obţine cu clei de tâmplărie. Modelajul final prin scoaterea treptelor este din cale afară de anevoios, deaceea trebue în general să renunţăm la el.

§ 556. — Reproducerea modelului pe plăci de sticlă sau celuloid şi suprapunerea acestor plăci într'o ramă potrivită de lemn sau de fier a fost propusă pentru reconstruirea obiectelor mici şi subţiri (vase, nervi, etc.). Procedeul acesta nu ne-a dat rezultate superioare reconstrucţiei grafice, care trebue prin urmare preferată în asemenea împrejurări (v. § 550).

In orice altă împrejurare trebue să ne adresăm reconstrucţiei plastice, singura capabilă să ne dea informaţii multilaterale şi lesne de citit.

MICROFOTOGRAFIA

ALEGEREA APARATULUI

§ 557. — Decisivă pentru mărirea admisă este apertura obiectivului. Nu trebue să trecem de înmiitul acestei aperturi, de exemplu, la apertura de 0,95 nu vom mări peste 950 de ori.

§ 558. — Mărirea *dorită* este decisivă pentru alegerea aparatului. Pentru măririle cuprinse între 1 : 1 şi 1 : 60, dispozitivele microscopice obişnuite, cuprinzând obiectiv şi ocular, sunt inutilizabile în microfotografie, din pricina curburii prea puternice a imaginii formate.

Pentru asemenea măriri sunt absolut necesare obiective-lupă, special construite pentru scopurile microfotografiei, care au corecturi speciale, tocmai pentru aceste scopuri. Ele se întrebuinţează *fără ocular*, cu burdufuri în general lungi şi format mare de placă. Desfăşurarea întregului aparat se face mai avantajos pe orizontală.

§ 559. — Dispozitivul de mai sus se numeşte microscop simplu. La asemenea microscop simplu se pot adapta totuşi şi aparate cu format mic de placă, sau cele cu format de film 24 × 36 mm (de tip « Chiev » sau « Leica »). In toate aceste împrejurări, punerea la punct se face pe sticlă mată (§ 583), iar pentru precizie mai mare pe sticlă limpede, care înlocueşte sticla mată, sau se găseşte în centrul ei. Lumina este abătută spre sticla mată cu ajutorul unei prisme cu reflexie totală, care poate fi îndepărtată în momentul fotografierii, pentru ca fascicolul luminos să cadă neslăbit pe film. Deservirea mecanismului de declanşare cere în asemenea împrejurare atenţie deosebită: se scoate mai întâi prisma din calea fascicolului luminos, şi numai după aceea se expune.

§ 560. — Sticla mată (sau cea limpede) este încorporată la o piesă intermediară, deasupra căreia se înşurubează camera cu filmul. Punerea la punct este înlesnită printr'o lupă, cu care putem privi imaginea de pe sticla mată (sau cea clară).

§ 561. — Problema măririi admise la camerele cu film normal (24 × 36 mm) se complică datorită copierii la scară a filmului. In asemenea împrejurare trebue să avem în vedere că mărirea finală trebue să fie înmiitul aperturii. Aşa dar, dacă vom mări filmul prin copiere de 10 ori, negativul nu trebue să fie mai mult decât însutitul aperturei, de exemplu: la raportul 1 : 4,5 $\left(\text{apertura } 0{,}11 = \frac{0{,}5}{4{,}5}\right)$ între diametrul obiectivului şi distanţa focală, raport obişnuit la lupele microfotografice, nu vom mări mai mult ca cca 11 ori. Copierea va aduce mărirea la limita permisă de 110.

§ 562. — Dacă imaginile pozitive vor fi reproduse grafic ca autotipii, sunt admise depăşiri ale măririlor mai sus fixate de 50—100 %.

§ 563. — Pentru măriri peste 1 : 60 vom putea întrebuinţa microscopul compus, înzestrat cu obiectiv şi ocular. Obiectivele trebue să fie corectate sub raportul aberaţiei sferice şi cromatice. Această din urmă corecţie este dusă la maximum la obiectivele apocromate. Asemenea obiective trebue întrebuinţate numai cu oculare « de compensaţie », altminteri căpătăm imagini cu halo colorat. Microfotografia nu se poate dispensa de apocromate şi de oculare de compensaţie.

§ 564. — Imaginea dată de sistemele expusă la § 561—563 nu sunt perfect netede. Acest cusur nu are prea mare importanţă, dacă ne mărginim numai la porţiunea centrală a imaginii. Dacă vrem să obţinem imagini perfecte până la periferie, trebue să întrebuinţăm fie oculare

366

speciale, care netezesc imaginea (« homale »), fie obiective speciale, cu aceleaşi proprietăţi (planocromate, periplane).

Homalele nu pot fi întrebuinţate pentru observaţie directă, pentrucă razele emergente nu se întretaie în pupila observatorului, ca la ocularele obişnuite. Ele sunt creaţiuni speciale pentru microfotografie.

§ 565. — La microscopul « compus », regulile pentru mărirea admisibilă sunt aceleaşi ca pentru microscopul simplu (§ 557 şi 562). Obiectivele, având distanţa focală mică, nu au nevoie de un burduf prea lung; dimpotrivă, la microscopul compus, ne vom putea mulţumi cu scurte piese de legătură între camera fotografică şi tubul microscopic.

§ 566. — Relaţiile dintre microscop şi camera fotografică pot fi diferite:

a) Camera (tip « burduf ») se aşează peste microscop cu ajutorul unui manşon intermediar, cu rolul de a împiedica pătrunderea luminii din afară. Acest soi de cameră e susţinută de un stativ. Camera se încarcă la un capăt cu plăci fotografice, sau suportă un aparat cu film « normal » (24 × 36 mm). *Punerea la punct pe sticlă mată.*

b) Astăzi se bucură de mai largă răspândire tuburile intermediare şi camerele care pot fi aşezate direct peste microscop, fără stativ special de susţinere. Punerea la punct se face fie prin lunetă, interpusă între camera fotografică şi microscop (*mai puţin bine*, pentrucă ochiul « compensează » şi astfel se înşeală), fie pe sticlă mată (mult mai bine). Dacă sticla mată aparţine aparatului, cum e cazul la « Exakta », totul decurge foarte simplu. Dacă sticla mată aparţine unei piese intermediare cu prismă de reflexie totală, ca la « Miflex », atenţia trebue să fie mare, pentru motivele arătate la § 559.

c) Preferinţa constructorilor a mers în timpul din urmă către aparatele în care microscopul şi camera fac un singur corp indivizibil, bun numai pentru microfotografie. Tipul acestor construcţii este panfotul. Asemenea aparate pot fi întrebuinţate fie cu camere cu burduf, fie cu camere pentru film normal (tip « Chiev » sau « Leica »). Echipamentul lor optic este împins la mare perfecţiune şi problema esenţială a microfotografiei, *luminatul*, elegant rezolvată.

Care din aceste tipuri merită preferinţă?

Aparatele expuse sub *b* şi *c*, dar mai ales cele de sub *c*, sunt simple ca manevră şi pot fi echipate cu camere cu film normal, de largă răspândire. Aceste calităţi le vor asigura întâietatea.

LUMINATUL

§ 567. — Lumina este decisivă pentru reuşita microfotografiei. Atâta vreme cât nu avem dispozitive speciale de luminat, ci numai condensatorul obişnuit sau chiar condensatorul Abbe, vom utiliza pentru luminat principiul lui *Köhler*.

§ 568. — Ca sursă de lumină vom da preferință becurilor de voltaj mic și amperaj mare, cu bună luminozitate. Ele necesită transformatoare. Filamentul lămpii nu trebue să descrie figuri complicate în spațiu. Dispoziția filamentului în șiruri paralele și coplanare, nu prea numeroase (cam 3), este de dorit. Inaintea lămpii avem locul sticlei mate, pentru uniformizarea luminozității. Inaintea sticlei mate este așezat *colectorul*, lentilă sau sistem de lentile convergent, care adună fascicolul luminos și *poate fi deplasat față de sursa luminoasă*. (Efectul acestei deplasări poate fi obținut și prin mutarea becului față de colector, dacă ultimul este fix). In sfârșit, înaintea colectorului este așezat un diafragm, numit al câmpului luminos, spre deosebire de diafragmul condensatorului, numit al aperturii.

§ 569. — Pentru microfotografie nu vom folosi decât oglinda plană a microscopului, *cea concavă nu poate fi întrebuințată în niciun caz.*

§ 570. — Alegerea condensatorului se face în raport cu obiectivul întrebuințat. Pentru imersie, cât și pentru obiectivele uscate cu apertura peste 0,50, vom întrebuința condensatorul cu echipamentul complect. Pentru obiectivele slabe ale microscopului compus (sub 0,50 apertură numerică) vom întrebuința condensatorul fără lentilă frontală. Obiectivele-lupă cu distanța focală mai mare de 35 mm vor fi împerechiate cu condensatoare speciale, numite «cu sticlă de ochelari». Cu toate aceste sisteme vom lumina după rețeta lui *Köhler* (§ 573).

§ 571. — Condensatorul Berck cu două diafragme ne scutește de manipulările mai complicate ale punerii la punct a luminii după Köhler. Dacă suntem în posesia unui astfel de condensator (echipamentul unui panfot cuprinde un asemenea condensator), lucrul este simplificat, pentrucă lentila frontală are diafragmul ei, care funcționează la aperturile mari, iar lentila inferioară are și ea un diafragm, care funcționează la aperturi mici.

§ 572. — Sistemele de luminat, numite pancratice, reprezintă de fapt dispozitive *Köhler* gata realizate. Aceste dispozitive realizează automat acordul dintre obiectiv și diafragmul aperturii, datorită unui inel gradat, pe care-l putem manevra astfel încât să așezăm numărul aperturii obiectivului, gravat pe inel, în fața unei linii de reper. Condensatorul pancratic reprezintă echipamentul ideal pentru aparatele microfotografice care se așează direct pe microscop.

§ 573. — Pentru condensatoarele obișnuite vom respecta regulile următoare (după *Köhler*, 1893):

a) Echipăm microscopul cu condensatorul ales după regulile expuse la § 570 al acestui capitol.

b) Pe o hârtie albă ținută în planul diafragmului de apertură (irisul condensatorului) reproducem imaginea sursei de luminat. Atragem din nou atenția că nu putem folosi în acest scop decât oglinda plană a microscopului, ca fiind singura care nu alterează în sensul convergenței sau divergenței mersul fascicolului luminos. Imaginea sursei se pune

la punct prin deplasarea colectorului față de bec, sau invers, a becului față de colector. Acum introducem sticla mată.

c) Cu obiectivul ales, punem la punct imaginea de pe port-obiect (lamă) și mișcăm oglinda până obținem în câmp maximum de luminozitate.

d) strângem diafragmul câmpului luminos (dinaintea colectorului) (v. § 568) și apoi manevrăm condensatorul *până apare precis conturul diafragmului acestuia în câmpul vizual.* Punerea la punct — realizată la punctul *c* — n'a fost, bineînțeles, schimbată.

e) Acum manevrăm oglinda plană, astfel ca să așezăm *central* conturul diafragmului de câmp luminos, pus la punct înainte prin mișcarea condensatorului.

f) Deschidem diafragmul câmpului luminos, încetul cu încetul, până când marginea lui coincide just cu marginea câmpului vizual.

g) Scoatem acum ocularul și prin tubul microscopului observăm pupila obiectivului. Strângem diafragmul de apertură, astfel ca să micșorăm pupila la jumătate, cel mult la două treimi.

h) Reintroducem ocularul. Dacă e cazul, corectăm lungimea tubului microscopic pe lungimea camerei fotografice, și ne pregătim de punerea la punct pe sticlă mată sau clară.

§ 574. — La ocularele microscopului compus, cu distanțe focale mari (mărire slabă), e nevoie de corecturi ale lungimii tubului microscopic după lungimea camerei, pentru a păstra starea bună de corecție a sistemului de lentile și, prin urmare, precizia imaginii.

Dăm mai jos un tabel în care se arată în mm lungimea cu care trebue alungit tubul microscopic pentru focar dat și lungime dată a camerei.

Lungimea camerei în mm	Distanța focală a ocularului în mm							
	f=50	f=36	f=25	f=20	f=17	f=12,5	f=10	f=8,4
500	5	2,5	—	—	—	—	—	—
400	6	3	1,5	—	—	—	—	—
300	8,5	4,5	2	—	—	—	—	—
200	12,5	6,5	3	2	—	—	—	—
100	28	10	5	3	2	—	—	—

Există oculare care se corectează cu ajutorul unei scale gradate, după lungimea camerei; în asemenea caz nu mai e nevoie să lungim tubul microscopic. La fel sunt corectate homalele (§ 564).

§ 575. — Nu coborîți condensatorul la întâmplare, ghidați-vă după regula Köhler. Nu diafragmați mai mult decât e necesar, respectați cele spuse la § 573, pct. *g*. Nerespectarea acestor recomandări duce la artefacte fotografice.

§ 576. — In principiu procedăm la fel cu microscopul simplu. Imaginea diafragmului din colector este produsă în deschiderea condensatorului. Ea este apoi trimisă mai departe, în pupila obiectivului, printr'o lentilă negativă, ce se așează înaintea colectorului. Diafragmarea se face numai la nivelul colectorului, câmpul luminos se limitează aici prin diafragmul condensatorului cu « sticle de ochelari », dacă există.

EXAMENUL ȘI MICROFOTOGRAFIA IN CÂMP INTUNECAT

§ 577. — Sursa luminoasă are aceleași calități ca pentru câmpul luminat. Foarte importantă este prezența sticlei mate (în absența ei se instalează așa numite erori de azimut), fără de care nu putem obține corect câmpul întunecos. Condensatorul pentru câmp întunecos trebue legat de lama port-obiect printr'o picătură de ulei de imersie, dacă îl întrebuințăm la apertură mare (între 0.70 și 1.30) a obiectivului; pentru aperturi sub 0.70 se pot întrebuința și condensatoare « uscate », fără imersie.

§ 578. — **Principiul lui Köhler** se aplică și la câmpul întunecos. Etapele sunt următoarele:

a) Scoatem ocularul, obiectivul și condensatorul. Strângem diafragmele. Așezăm pe extremitatea superioară a tubului o sticlă mată (sau hârtie translucidă) și producem cu ajutorul oglinzii plane o pata luminoasă în centrul deschiderii tubului. *De aici încolo trebue să avem grijă ca oglinda să nu mai miște în tot restul operațiilor.* Centrările se vor face numai prin deplasarea condensatorului.

b) Deschidem diafragmul aperturii (la aparat Abbe) și introducem *condensatorul de câmp întunecos*, apoi un obiectiv slab (A 0.20) și ocular de mică putere (5 × — 8 ×).

c) Coborîm condensatorul și depunem pe lentila lui frontală o picătură de ulei de imersie. Il ridicăm apoi cu băgare de seamă până face contactul cu lama port-obiect.

d) Acum punem la punct obiectul, din care nu trebue să apară luminată decât o zonă inelară, care îndeobște este așezată excentric. Cu ajutorul vizelor de centrat ale condensatorului, inelul este adus în mijlocul câmpului și prin manevrarea condensatorului (ridicare sau coborîre) inelul confluează într'o mică arie circulară centrală luminată.

e) Deschidem și închidem diafragmul colectorului, pentru a varia câmpul luminos și a manevra suplimentar condensatorul până la obținerea unui contur absolut net al acestui câmp.

f) Schimbăm obiectivul slab cu unul puternic de apertură mare (fie uscat, fie cu imersie) și strângem bine diafragmul colectorului. Corectăm din nou centrarea condensatorului pentru obiectivul puternic.

g) Inlocuim acum și ocularul, cu unul mai puternic (10 × — 12 ×). Deschidem diafragmul colectorului până la mărimea câmpului vizual și pregătim aparatul pentru microfotografie.

§ 579. — Lama port-obiect trebue să aibă o grosime de 0,8—1,2 mm, în niciun caz mai mult.

§ 580. — Este esențial ca în lichidul de imersie dintre condensator și lama port-obiect să nu existe nici cea mai mică bulă de aer; ea ar împiedica formarea câmpului întunecos.

§ 581. — Este indispensabil ca apertura obiectivului să nu întreacă apertura maximală a condensatorului. Dacă acesta este cazul, limităm apertura obiectivului printr'o pâlnie introdusă în interior sau prin iris (dacă există).

§ 582. — Preparatul trebue să fie extrem de îngrijit; orice impurități difuzează lumina, deschid tonalitatea câmpului întunecos, jenează observația și microfotografia.

PUNEREA LA PUNCT

§ 583. — Pe sticla mată, punerea la punct e suficientă pentru microscopul simplu. La microscopul compus se mai adaugă și sticla clară. Imaginea pe sticla clară se examinează principial cu lupa. In acest scop procedăm după cum urmează:

Sticla clară poartă gravată două linii în cruce pe una din fețele sale. Ținem sticla cu fața negravată spre observator și aplicăm pe această față lupa, pe care o manevrăm până ce liniile în cruce apar limpede. Aceasta este poziția lupei cu care vom pune la punct.

După ce am fixat întinderea și scara de mărire a imaginii pe sticla mată, o înlocuim cu sticla clară. Manevrăm vizele microscopului până ce sub lupă apar clare în acelaș timp imaginea obiectului și liniile în cruce.

§ 584. — Totuși, punerea la punct de finețe se execută cu un mijloc mai obiectiv, prin așa numita metodă a paralaxei. Dacă, privind mereu prin lupă, vom mișca în direcții diferite, dar cu mică amplitudine capul, vom băga de seamă că imaginea obiectului se mută față de liniile în cruce, « are paralaxă ». Mișcând microviza, ajungem în acea situație în care imaginea nu se mai deplasează față de cruce, nu mai are paralaxă. Aceasta este situația de optimă punere la punct.

§ 585. — Dacă suntem obligați a pune la punct cu ajutorul lunetei, fără sticlă mată, procedăm în felul următor:

Prin manevra ocularului lunetei fixăm precis liniile în cruce ale lunetei care sunt conjugate cu planul plăcii fotografice. Apoi manevrăm vizele microscopului, până ce apar clar în acelaș timp și crucea și imaginea. Și în această împrejurare, criteriul mai obiectiv al « paralaxei » va aduce decizia (v. § 584).

§ 586. — La camerele cu reflexie totală prin prismă trebue ca totdeauna — înainte de a pune la punct — să tragem caseta sau să schimbăm filmul prin acționarea mecanismului de transport. Aceasta este necesar, deoarece manevrele întrucâtva brutale ale trasului casetei, respectiv ale schimbării filmului, ar putea turbura punerea la punct. Așa dar, ordinea operațiilor este aceasta: *trage mai întâi caseta (schimbă filmul) și numai apoi pune la punct.*

TIMPUL DE EXPUNERE

§ 587. — Celulele fotoelectrice speciale pot da indicații pentru fotografia în câmp luminos. Nu sunt utilizabile în câmp întunecos.

§ 588. — In cazul plăcilor, timpul optim de expunere se poate stabili expunând diferit fragmente deosebite ale imaginii. In acest scop, pe închizătorul casetei există o gradație dela 0 la 60 trecând prin următoarele valori: 0, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, care arată în același timp ce parte din placă trebue expusă și cât timp trebue expusă. La început se expune toată placa (dela diviziunea 0 la 60) timp de un minut (sau o secundă sau o sutime de secundă). Apoi se împinge închizătorul până la diviziunea 1 și se mai expune odată același timp, astfel că partea de placă expusă a cumulat acum 2 minute (secunde, sutimi de secundă) de expunere. Se introduce apoi închizătorul până la diviziunea 2 și se expune restul plăcii 2 minute (respectiv secunde sau sutimi de secundă). Acest rest a cumulat acum 4 minute expunere (respectiv secunde sau sutimi de secundă). Tot astfel se procedează diviziune cu diviziune până la ultima.

Revelăm placa și citim timpul optim de expunere după fâșia cea mai bine expusă a plăcii.

§ 589. — Procedeul descris mai sus are desavantajul de a oferi spre comparație părți diferite ale imaginii. Cu ajutorul unui așa numit «multiplicator». putem căpăta timpul just de expunere pe unul și același obiect fotografiat. La multiplicator, în loc de a menține placa fixă și a varia deschiderea prin manevrarea închizătorului, menținem fixă o spărtură de anumită lărgime în casetă și mobilizăm placa, astfel ca diferite porțiuni ale plăcii să reprezinte mereu aceeași parte a obiectului, luată cu timpuri de expunere diferite. In felul acesta, aprecierea timpului de expunere optim este mai sigură decât după metoda arătată la § 588. Durata este ca și mai înainte 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60.

§ 590. — Pentru filmul de 24 × 36 mm nu se pot face încercări de felul celor de mai sus, din cauza micimii fotografiei. Aici vom lua câte cinci prize de pe același obiect, și vom alege pe cea mai bine expusă. Cu experiența crescută vom putea reduce acest număr la trei, sau numai două, cu bune rezultate.

§ 591. — Pentru a ne putea orienta în mare asupra timpului de expunere, va trebui să ținem seama de faptul că timpul de expunere variază după anumite legi cu sensibilitatea plăcii sau filmului, exprimată în DIN-e. In condiții egale, fiecare scădere de 3 DIN-e echivalează cu dublarea timpului de expunere.

Este important, mai ales la film, de a avea un optim de expunere. Expuneri prea lungi, care nu sunt totuși supraexpuneri evidente, păcătuesc prin redarea necorectă a dimensiunilor, în particular a structurilor fine. Diametrul acestor structuri sporește proporțional cu logaritmul timpului de expunere și cu turbureala emulsiei (astrogama). De aici importanța unui timp just de expunere, tocmai la fotografierea structurilor fine.

§ 592. — Alegerea filtrelor la expunere se face în raport cu colorația obiectului și cu natura filmului. De exemplu, preparatele obișnuite cu multă eozină vor necesita filtre verzi, dacă lucrăm cu placă sau film izocrom. Detalierea tuturor cazurilor nu poate fi făcută în acest loc. Dacă ne este cunoscută curba de sensibilitate a filmului la culoare, problema alegerii filtrului în raport cu obiectul de fotografiat nu prezintă dificultate.

REVELARE ȘI FIXARE

§ 593. — Rețetele de revelator ale comerțului dau rezultate mediocre sau submediocre; în particular rodinalul, pe care nu-l recomandăm decât pentru Izocrom de 18/10 DIN-e.

§ 594. — Un bun revelator pentru film (Izocrom sau Izopan de 10/10—18/10 DIN-e) și pentru placă este revelatorul cu pirocatehol, după formula următoare: Sol. A 100 cc apă distilată, 8 g pirocatehol, 2,5 g sulfit de sodiu cristalizat care se disolvă pe rând; Sol. B 100 cc soluție hidroxid de sodiu 10%.

§ 595. — Pentru microfotografie vom întrebuința următoarele amestecuri: *a)* pentru detalii și revelaj moale: 100 părți apă, 3 părți sol. A, 4 părți sol. B. *b)* pentru revelaj normal: 10 părți apă. 3 părți A, 3 părți B. Durata revelajului este $1^1/_3$—2 minute la 20°. Pentru formula a) ne trebue 3 minute la 18°. Pentru formula b) ne trebue 6 minute la 18°.

§ 596. — Obișnuitul revelator cu metol-hidrochinonă este deasemenea foarte bun, deși are indicații mai rare. Soluția-mamă se pregătește din 1000 cc apă distilată, 6 g metol, 10 g hidrochinonă, 125 g sulfit de sodiu cristalizat, 80 g carbonat de sodiu anhidru, 4 g bromură de potasiu care se disolvă pe rând.

Pentru întrebuințare se va dilua o parte soluție-mamă cu 3 părți apă. Durata revelării este de 6 minute la 18°.

§ 597. — Pentru contraste vii pe plăci cu sensibilitate mică se poate întrebuința cu folos un revelator cu hidroxid de sodiu şi hidrochinonă, ce se prepară din două soluții-mamă :

Sol. A. 1000 cc apă distilată, 2 g hidrochinonă, 25 g metabisulfit de potasiu, 25 g bromură de potasiu.

Sol. B. 1000 cc apă distilată, 50 g hidroxid de sodiu.

Inainte de întrebuințare se amestecă părți egale din cele două soluții. Durata revelării este de 2—4 minute la 18°.

§ 598. — Ca fixator întrebuințăm obişnuita baie acidă: 1000 cc apă, 200 g tiosulfat de sodiu, 30 g metabisulfit de potasiu.

Durata fixării 10—15 minute la 18—20°, apoi spălare în apă curgătoare timp de $^1/_2$ —1 oră.

PARTEA SPECIALĂ

COLORAȚIILE NUCLEARE

§ 599. — In grupul coloranților nucleari folosiți în histopatologie intră carminul, hematoxilina, tionina, albastrul de toluidină, albastrul de metilen, kernechtrotul, safranina, naftazarina şi încă alții de importanță mai mică.

Pentru a putea colora nucleii, toate aceste substanțe trebue să se comporte ca material colorant bazic. Dacă nu au însuşirea aceasta, ea trebue să le fie conferită de complexul din soluția colorantă sau de formula chimică sub care sunt folosite.

§ 600. — Carminul, colorant natural, este cea mai veche substanță utilizată pentru colorarea țesuturilor vegetale şi animale. Folosirea lui a căpătat o desvoltare şi mai mare prin asocierea sa cu aluminiul. Pentru colorarea nucleilor în roşu se folosesc îndeosebi carmalaunul sau paracarminul, iar pentru colorarea lor în negru sau albastru-violet se recomandă în primul rând carminul cu alaun de crom şi cel cu sulfat de aluminiu.

Pentru colorarea nucleilor, carminul se disolvă într'un mediu puternic acidulat sau prin adăugare de alaun de potasiu sau sulfat de aluminiu soluțiilor. In aceste cazuri el colorează nucleii celulelor ca un material colorant bazic, cu o încărcătură electrică negativă, proprietatea care intră în funcție şi pentru colorarea cartilajelor şi mucusului.

§ 601. — Folosirea carminului în histopatologie pentru colorarea nucleilor s'a restrâns mult astăzi prin apariția şi folosirea celorlalți coloranți nucleari; totuşi, el îşi păstrează întreaga valoare într'o serie întreagă de cazuri. Astfel, el serveşte pentru colorarea nucleilor după reacția fierului, colorația grăsimilor cu clorofilină, reacția oxidazelor, impregnații argentice, etc., ca şi în cercetările obişnuite de histopatologie, când se urmăreşte un contrast de culoare. Coloranții cu bază de carmin au o largă întrebuințare în embriologie şi histochimie.

§ 602. — Hematoxilina, substanță cristalizabilă, incoloră sau slab gălbuie, este extrasă din lemnul *Haematoxylon campechiarum*. Hematoxilina ca atare nu este un corp cu proprietăți colorante, dar ea capătă

aceste proprietăți prin oxidare cu pierderea a doi atomi de hidrogen (care se produce destul de rapid), cu transformarea hematoxilinei în hemateină.

Deaceea, toate soluțiile preparate din hematoxilină sunt lăsate un timp să matureze, adică să se oxideze transformându-se în hemateină. Această oxidare poate fi accelerată prin adăugarea unor oxidanți puternici cum ar fi iodatul de sodiu, apa oxigenată, etc. In acelaș scop, de a avea oricând la dispoziție o soluție care să conțină hemateină, se recomandă ca în laborator să existe preparată o soluție alcoolică 10% de hematoxilină, în alcool 95°, din care să se prepare la nevoie soluțiile diluate.

Atât hematoxilina, cât și hemateina nu pot produce colorații decât prin asocierea lor cu o bază, cu care ele formează un lac, o sare complexă. Baza utilizată poate fi o sare de aluminiu, de fier, etc., care fie că se asociază soluției colorante, fie că se folosește ca mordant. Prin continuarea oxidării, hemateina se transformă în oxihemateină, substanță cu proprietăți colorante reduse.

§ 603. — Colorațiile cu hematoxilină sunt progresive sau regresive. Astfel, colorațiile cu hemalaun sunt colorații progresive și numai în cazuri speciale pot fi folosite ca regresive.

Dimpotrivă, colorațiile cu celelalte soluții de hematoxilină sunt colorații regresive, necesitând pentru acest motiv o foarte bună însușire a tehnicii. Hematoxilina este în prezent colorantul nuclear cu cea mai mare răspândire, datorită colorației precise obținute și a stabilității soluțiilor colorante.

§ 604. — Tionina, albastrul de toluidină și albastrul de metilen fac parte din grupul substanțelor colorante sintetice, și anume din grupul tiazinelor, substanțe remarcabile prin proprietățile lor metacromatice.

Pentru reușita colorațiilor cu tionină și albastru de toluidină este recomandabilă fixarea în amestecuri cu sublimat, lichidul lui Bouin, soluția fixatoare a lui Flemming sau alcoolul absolut.

CARMINUL

§ 605. — **Soluția alcoolică de carmin boraxat.** Se iau 2—3 g carmin și se amestecă cu 4 g borax, triturându-le într'un mojar; fierbere îndelungată în 100 cc apă distilată până se disolvă. După răcire se adaugă 100 cc alcool 70%. Se lasă apoi să stea câteva săptămâni sub un vas acoperit în care timp se agită des. Se filtrează. Piesele se colorează în bloc: ele se scot din fixator și după o spălare serioasă sunt trecute din alcool 70°. Colorarea durează dela câteva ore la câteva zile, în funcție de mărimea pieselor. După colorarea completă, piesele se pot controla pe câteva secțiuni. Nu se trec prin apă. Diferențiere în alcool de 70° acidulat, preparat astfel: 0,25—0,50 cc acid clorhidric pentru 100 cc

alcool 70°. Blocurile se lasă în acest diferențiator până ce nu se mai produc nori de colorant. Diferențiatorul se schimbă de câteva ori. In general, diferențierea durează între 1—3 zile. După o bună diferențiere, blocurile care erau colorate în roșu-albăstrui devin roșii-carmin. Sunt spălate în alcool 70° și sunt trecute prin bateria de deshidratare și clarificare pentru a fi incluse în parafină sau celoidină. Tratarea cu alcool anacid este foarte importantă, pentrucă numai astfel colorația este limitată pe nuclei.

§ 606. — Materialul fixat în amestecuri cu sublimat este cel mai indicat pentru această colorație, care pune în evidență foarte bine cromatina. Fixatorii cu bicromat permit colorarea ulterioară, dar piesele trebue bine spălate. Fixarea cu acid osmic nu permite colorarea ulterioară. Soluția apoasă de carmin boraxat nu se utilizează prea mult în practică, alterându-se foarte rapid. Colorantul acesta nu convine pentru secțiunile la parafină lipite, ci numai pentru cele nelipite și pentru piese întregi.

§ 607. — **Carminul metilic** se prepară astfel: se fierb 4 g carmin cu 4 g borax în 200 cc apă distilată timp de cel puțin o oră, evaporându-se până la 50 cc; după răcire se aduce volumul la 150 cc; apoi se adaugă agitând continuu 100 cc alcool metilic absolut. Se filtrează după 24 de ore. Diferențierea în alcool 50° acidulat cu acid clorhidric 0,5—1%.

§ 608. — **Carminul litinat.** Preparare: se fierb 2,50 g carmin în 100 cc soluție apoasă saturată la rece de carbonat de litiu timp de 10—15 minute, pe baie de apă. Se răcește. Se filtrează înainte de întrebuințare. Soluția de carbonat de litiu se prepară din 1 g carbonat de litiu la 100 cc apă distilată. Colorarea secțiunilor durează 2—5 minute. Diferențiere imediată în 0,5—1% alcool clorhidric și spălare bogată în apă. Soluția colorează puternic și rapid și reușește în cazuri în care fixarea nu permite o bună colorare cu alte carminuri.

Pentru colorarea blocurilor din țesuturi mai desicate metoda este mai puțin indicată, deoarece din cauza conținutului mare în alcali are adesea un rol macerant. Această soluție colorantă servește și pentru colorațiile vitale.

§ 609. — **Cromalaun-carminul** dă o colorație foarte clară și pură a nucleilor într'o nuanță albastră neagră-închis. Preparare: se disolvă la cald 6 g alaun de crom pur în 100 cc apă distilată. Se adaugă 1 g carmin. Se fierbe amestecul 15 minute și se filtrează după răcire. Se adaugă timol. Soluția colorată albastru-închis este foarte stabilă. Pentru colorarea secțiunilor, ele sunt trecute din apă distilată în soluția de colorant. Se țin aici 30 de minute — 1 oră. Se produce o discretă supracolorare. Dacă colorarea este prea intensă, se diferențiază cu alcool clorhidric 0,5% și se spală bine în apă distilată. Se deshidratează cu alcool și se montează cu balsam, trecându-se prin xilen.

Rezultate. Cromatina nucleilor apare colorată în albastru-negru, restul țesuturilor în albastru-violet-delicat.

Coloraţia reuşeşte îndeosebi după fixarea în amestecuri cu acid picric şi sublimat. După fixarea simplă în formol, înainte de a trece piesele în alcool, ele vor fi bine spălate cu apă.

Colorarea fondului se poate face cu eritrozină, oranj, eozină, tiazină, acid picric sau picrofuxină.

§ 610. — **Carminul aluminat** dă o coloraţie foarte clară a nucleilor. Se prepară astfel: se disolvă la cald 6 g sulfat de aluminiu în 100 cc apă distilată. Se adaugă 1 g carmin. Se fierbe amestecul 15 minute şi se filtrează după răcire. Se adaugă timol.

Procedeul de lucru este acelaş ca mai sus.

§ 611. — **Carminul cu alaun** după Grenacher dă o coloraţie foarte bună pentru nuclei. Se disolvă la cald 4 g alaun de potasiu în 100 cc apă distilată. Se adaugă apoi 2 g de carmin şi se fierbe 20—30 de minute. Se răceşte, se filtrează. Se adaugă apoi 1 cc formol sau puţin timol. Din apă distilată, secţiunile se trec în soluţia colorantă. Coloraţia durează dela 30 de minute — 24 de ore, după cum avem de a face cu secţiuni sau piese mai groase. Se trec apoi din nou în apă distilată, până ce nu mai iese culoarea din ele. Nici colorantul, nici apa nu trebue să conţină urme de alcool.

Coloraţia se pretează mai bine pentru secţiuni decât pentru piese, dar în niciun caz pentru piese groase.

§ 612. — **Carmalaunul lui Mayer** dă o coloraţie intensă, curată, a nucleilor. Preparare: se disolvă la cald 10 g alaun de potasiu şi 1 g carmin acid în 200 cc apă distilată. După răcire se filtrează şi se adaugă 1 cc formol sau 0,2 g acid salicilic spre a evita desvoltarea microorganismelor. Colorarea secţiunilor: din apă distilată secţiunile sunt trecute în soluţia colorantă timp de 15 minute. Spălare 2—3 minute în apă distilată. Dacă dorim să decolorăm citoplasma, secţiunile vor fi trecute câteva secunde sau minute (control microscopic!) într'o soluţie apoasă de alaun 0,5—1%, după care urmează o spălare abundentă în apă.

Colorarea blocurilor. Piesele sunt trecute 24—48 de ore în colorant. Pentru diferenţiere se ţin apoi 12—24 de ore într'o soluţie de alaun 1%. Se spală un timp egal în apă.

Pentru ca soluţiile vechi să nu-şi piardă colorabilitatea, se adaugă acid acetic 10%.

§ 613. — **Paracarminul** dă o coloraţie nucleară, pură, în tonuri ceva mai clare decât carmalaunul. Se utilizează în deosebi în cazul în care trebue evitat contactul cu soluţii apoase, ca de exemplu pentru granulele de secreţie ale glandelor mucoase din bronchii. Soluţia este foarte stabilă. Preparare: se disolvă la cald 1 g acid carminic, 0,50 g clorură de aluminiu şi 4 g clorură de calciu, în 100 cc alcool 70°. Se lasă să se răcească şi să se sedimenteze. Apoi se filtrează.

Colorarea secţiunilor. Din apă distilată sau alcool 70° secţiunile se trec 15—30' în colorant. Se spală apoi cu alcool 70%. Montare în alcool, xilen, balsam.

Pentru *colorarea blocurilor*, acestea se ţin în colorant 24—48 de ore. Se spală apoi un timp în alcool 70° acidulat în proporţie de 2,5 cc acid acetic glacial la 100 cc alcool 70°.

Observaţii. Pentru a fi colorabile cu carmalaun sau paracarmin, piesele nu trebue să fie alcaline sau să conţină mult calciu, întrucât acestea le scad colorabilitatea.

Pentru o colorare pură a nucleilor, piesele sau secţiunile se pot trece printr'o soluţie alcoolică acidă (acid acetic 2 cc, alcool 70° 100 cc), după care sunt spălate cu alcool 70° sau apă şi apoi se trec în colorant.

După colorarea nucleilor cu carmin sunt recomandabile coloraţii de fond care să contrasteze cu culoarea roşie a nucleilor. Deaceea se vor folosi coloranţi cu bază de acid picric, indigo, albastru de anilină, oranj, verde lumină, etc.

HEMATOXILINA

§ 614. — Hemalaunii sunt coloranţi cu bază de hematoxilină. Colorarea cu hemalaun este o colorare progresivă.

§ 615. — **Hemalaunul lui Mayer** este unul din cei mai buni coloranţi nucleari, permiţând totodată coloraţiile de contrast, ca şi unele din tehnicile de histochimie. Preparare: hematoxilină cristalizată 1 g; iodat de sodiu 0,2 g; alaun de potasiu 50 g; apă distilată 1000 cc; se disolvă mai întâi alaunul de potasiu în apă, apoi se adaugă hematoxilina. După disolvarea acesteia se adaugă iodatul de sodiu care produce oxidarea rapidă a hematoxilinei. Soluţia este lăsată să matureze 3—4 zile. Se filtrează înainte de întrebuinţare.

Colorantul se lasă în contact cu preparatele timp de 10—12 minute. Se spală apoi cu apă distilată. Intrucât nucleii apar coloraţi în roşu-cafeniu, pentru accentuarea coloraţiei se trec preparatele în apă de robinet care, datorită sărurilor alcalino-pământoase pe care le conţine, virează culoarea în albastru. Pentru accelerarea virării în albastru se pot pune în apă câteva picături dintr'o soluţie apoasă saturată de carbonat de litiu sau bicarbonat de sodiu.

In caz de supracolorare se pot trece secţiunile prin amestecul alcool 100 cc, acid clorhidric 1 cc, timp de câteva minute. După diferenţiere, secţiunile trebue bine spălate cu apă şi cufundate în apă de robinet, eventual alcalinizată ca mai sus, pentru virarea coloraţiei în albastru. După colorările pentru fond, se pot folosi diferite metode de montare.

§ 616. — **Hemalaunul acid** al lui Mann se prepară din hemateină şi prezintă proprietatea, în unele cazuri necesară, de a nu colora numai nucleii. Preparare: se disolvă 0,5—2 g de hemateină în 25 cc alcool 95° amestecat cu 10 cc acid acetic glacial. După disolvarea complectă se adaugă 100 g glicerină şi încă 75 cc alcool 95°. Se amestecă bine. Se disolvă apoi 10 g alaun de potasiu în 100 cc apă distilată caldă. După

disolvare se amestecă cu soluția de hemateină. Se lasă să matureze la lumină, câteva zile, într'o sticlă bine închisă. Se filtrează înainte de întrebuințare. Colorarea durează 10—15 minute. Nu necesită diferențiere, decât dacă urmărim colorarea exclusivă a nucleilor.

§ 617. — Hemalaunul Mayer modificat permite o bună colorare a nucleilor. Se folosește îndeosebi în cazurile când nu este necesară o diferențiere după colorație. Prepararea soluțiilor: dintr'o soluție alcoolică de hematoxilină 10% (5 g hematoxilină la 50 g alcool 96°) se iau 7,50 cc (adică 75 ctg hematoxilină), care se toarnă peste o soluție caldă, făcută din 500 cc apă și 37,5 g alaun de potasiu (75 g alaun la 1000 cc apă). Soluția de alaun va fi filtrată în prealabil. Se adaugă apoi iodat de potasiu în proporție de 30 ctg pentru 1000 cc (pentru 500 cc se adaugă deci 15 ctg iodat de potasiu), în scopul maturării mai rapide a hematoxilinei prin oxidarea ei. Iodatul se disolvă în puțină apă și se adaugă apoi la soluția de mai sus. Se lasă să matureze circa 3 zile. Această soluție se păstrează ca soluție-mamă. La folosire se adaugă 0,5 cc acid acetic la 100 cc soluție colorantă.

Coloratia cu hemalaun pentru nuclei durează 10 minute. Colorantul se toarnă pe preparat după ce a fost filtrat. După colorare, secțiunile vor fi spălate cu apă de robinet și apoi trecute într'o soluție de carbonat de litiu sau în general o soluție alcalină, care înalbăstrește colorantul. După aceasta, cupele se spală din nou cu apă distilată. Nucleii apar colorați în albastru-negru. Pentru colorarea fondului se folosește obișnuit eozina. Se pot executa deasemenea tehnici pentru colorarea țesutului conjunctiv, pentru colorarea glicogenului, etc. Pentru colorarea cupelor la ghiață, hemalaunul este deosebit de prețios, folosirea lui îndepărtând necesitatea diferențierii.

§ 618. — **Glichemalaunul** Mayer este deasemenea un bun colorant nuclear, foarte stabil și foarte puternic, permițând o colorație rapidă. Preparare: se disolvă 0,4 g hemateină într'un vas în 1—2 cc de glicerină. După disolvare complectă se adaugă amestecul: apă distilată 70 cc, glicerină 30 cc, alaun de potasiu 5 g, preparat astfel: se disolvă mai întâi alaunul în apă distilată ușor încălzită; după disolvarea se adaugă glicerină; se poate acidula 2% cu acid acetic. Colorantul se filtrează înainte de întrebuințare. Nu necesită maturare, hemateina fiind forma maturată a hematoxilinei.

Colorarea durează 10 minute. Dacă s'a produs supracolorarea se poate diferenția cu alcool clorhidric ca pentru hemalaun. După colorare sau diferențiere, secțiunile sunt trecute în apă alcalinizată.

§ 619. — **Hematoxilina ferică Heidenhain** este unul din coloranții cei mai prețioși pentru multiplicitatea detaliilor structurale nucleare și extranucleare pe care le poate pune în evidență. Este un colorant puternic și durabil, totodată dând o colorație foarte precisă și ușor de analizat cu mijloacele optice cele mai puternice. Inainte de colorare, preparatele vor fi supuse mordansării.

Pentru buna reușită a coloratiei este necesară însă o perfectă însușire a tehnicii de diferențiere, foarte complexă și delicată. Trebue observat că diferențierea nu este însă uniformă pe tot preparatul, așa încât necesită o alegere pentru studiu a câmpurilor celor mai reușite.

Cu hematoxilina Heidenhain nucleii se colorează în negru. Ea colorează totodată incluziile citoplasmatice, corpii protozoarelor, striațiile mușchilor striați, etc.

§ 620. — *Prepararea soluției colorante*: soluția de hematoxilină 1% se prepară dintr'o soluție hematoxilină 10% în alcool 95° (soluție-mamă). Soluția aceasta se lasă să matureze la lumină într'o sticlă albă, timp de 2—3 săptămâni. Soluția 1% pentru uz curent se prepară prin adăugarea de 90 cc apă distilată la 10 cc soluție hematoxilină 10%. Aceasta este soluția colorantă folosită.

§ 621. — *Mordantul* se prepară prin disolvarea a 3 g alaun de fier și amoniu cristale violete (cristalele galbene nu sunt bune de utilizat) în 100 cc apă distilată. Soluția se prepară imediat înainte de întrebuințare.

§ 622. — *Diferențiatorul* este tot o soluție apoasă de alaun, dar mai slabă, 1—2%. Nu se folosește în acest scop soluția întrebuințată ca mordant.

§ 623. — *Colorarea* comportă următorii timpi: 1) Mordansare în alaun de fier 30 de minute până la 24 de ore, în funcție de scopul urmărit. Pentru colorarea numai a nucleilor este suficientă o mordansare de 30 de minute până la o oră. Pentru colorarea detaliilor structurale celulare, mordansarea se va prelungi până la 24 de ore. 2) Spălare rapidă în apă distilată. 3) Colorare în soluție de hematoxilină, în funcție de scopul urmărit, dela 30 de minute pentru colorarea strict a nucleilor, până la 24 de ore pentru colorarea nucleilor și a celorlalte elemente structurale. In funcție de timp, culoarea cupelor variază între albastru și negru puternic. 4) Spălare rapidă în apă distilată. 5) Diferențiere în alaun de fier. Se va folosi o soluție diferită de aceea folosită ca mordant. Diferențierea va fi controlată microscopic. Intrucât diferențierea este progresivă, decolorând mai întâi colagenul, apoi citoplasma, incluziile, și în cele din urmă cromatina, ea poate fi urmărită și oprită la timp. Inainte de examinare, pentru control, lamele trebue spălate cu apă pentru a întrerupe diferențierea. Dacă diferențierea este prea puternică, se pot reintroduce secțiunile în baia de hematoxilină. 6) Spălare abundentă în apă distilată. 7) Colorare de fond eventual. Deshidratare și montare în balsam.

Rezultatele obținute variază în limite largi, în funcție de scopul urmărit și timpii mordansării, colorării și diferențierii. Cromatina apare colorată în negru-albastru, iar citoplasma în cenușiu-albăstrui sau incoloră. Coloratia prelungită pune în evidență: cromatina, centrozomii, granulele de secreție, cimentul intercelular, discurile contractile ale mușchilor (în negru).

Reamintim că aspectul secțiunii nu este uniform, așa încât vor fi alese pentru examinare zonele proprice ale preparatului.

§ 624. — **Varianta Masson.** Pentru a obține o colorație foarte pură a cromatinei și centrozomilor se recomandă diferențierea cu alcool picric. Mordansarea și colorarea se fac ca mai sus. După colorare, secțiunile sunt trecute în alcool 95°, apoi în amestecul: soluție saturată de acid picric în alcool 95°, 2 părți; alcool 95°, 1 parte. Decolorarea este lentă la 20—25°. Trebue controlată microscopic. Secțiunile vor fi controlate fără a le spăla de alcoolul picric care le imbibă. După decolorare, spălare cu apă. Decolorarea va fi dusă cu puțin peste ceeace este necesar, întrucât nuanțele se intensifică la spălarea cu apă care urmează diferențierii. Dacă după spălare diferențierea pare insuficientă, secțiunile sunt spălate cu alcool 95°, apoi reintroduse în alcool picric.

Prin acest procedeu, mitocondriile nu pot fi puse în evidență.

§ 625. — Masson recomandă ca în locul soluției de hematoxilină de mai sus să se folosească formula lui Regaud: hematoxilină cristalizată 1 g, alcool 10 g, glicerină 10 g, apă distilată 80 cc, care este folosită în general pentru colorarea nucleilor și a condriomului: 1) mordansare în soluție apoasă de alaun de fier (cristale violete) 4%, timp de 24 de ore; 2) spălare în apă distilată; 3) colorare 24 de ore în hematoxilină Regaud; 4) spălare în apă distilată; 5) diferențiere în alaun de fier 1% sub microscop; 6) spălare în apă de robinet; 7) deshidratare, xilen, balsam.

§ 626. — **Hematoxilina ferică Dobell** are avantajul față de metoda Heidenhain de a evita macerarea pieselor prin menținerea lor îndelungată în soluții apoase și totodată de a fi una din metodele rapide de colorare.

In acest scop, Dobell folosește soluții alcoolice pentru mordansare, colorare și diferențiere, îndepărtând totodată impedimentul unei colorații inegale cu o diferențiere foarte delicată, necesitate în metoda Heidenhain.

Tehnica colorării: 1) mordansare timp de 10 minute în soluția de alaun de fier 1% în alcool 70°; 2) spălare cu alcool 70°; 3) colorare 10 minute în soluție de hemateină 1% în alcool 70°; 4) spălare în alcool 70°; 5) diferențiere în soluția mordantă pentru frotiuri sau în alcool 70° acidulat la 0,6% cu acid acetic pentru secțiuni; 6) spălare bună în alcool 70°; 7) deshidratare, xilen, balsam.

§ 627. — **Hematoxilina Weigert** sau lacul feric este unul din coloranții cei mai utili prin finețea rezultatelor obținute. Se utilizează două soluții, păstrate separat, care se amestecă în momentul întrebuințării, în părți egale, turnând soluția B peste A.

Soluția A: hematoxilină 1% în alcool 95° (preparată eventual, pentru a nu mai aștepta maturația, din soluția-mamă de hematoxilină 10%). Soluția B: 4 cc clorură ferică 29% (soluție-mamă), 1 cc acid clorhidric oficinal, apă distilată q.s. pt. 100 cc. Soluția rezultată din amestec este bună de întrebuințare cel mult 24 de ore.

Colorare: 1) Fără să se filtreze, soluția colorantă se toarnă pe preparate. Se lasă 10—12 minute. 2) Se spală cu apă distilată. 3) Se diferențiază apoi în alcool acidulat 0,5% cu acid clorhidric. Diferențierea se face până ce culoarea cupelor, din albastră-violacee, devine cafenie. De preferat ca diferențierea să se facă sub control microscopic și să fie oprită când rămân colorați numai nucleii. 4) După diferențiere, secțiunile sunt spălate cu apă distilată. 5) Sunt trecute apoi într'un vas cu apă de robinet în care se toarnă câteva picături dintr'o soluție saturată de carbonat de litiu. Se lasă în această soluție până ce culoarea secțiunilor devine albastră-neagră. 6) Spălare cu apă distilată. 7) Se pot face apoi colorațiile de fond sau colorațiile speciale necesare. Nucleii apar în albastru-negru. Nucleolii sunt colorați în negru.

§ 628. — **Hematoxilina Loyez**, folosită pentru colorarea mielinei.

După 1) deparafinare; 2) mordansare 24 de ore în soluția alaun de fier 4%; 3) spălare rapidă cu apă distilată; 4) colorare 24 de ore în soluția de hematoxilină litinată, preparată prin disolvarea în 10 cc alcool absolut a 1 g hematoxilină, diluare la 100 cc și adăugarea a 2 cc soluția saturată de carbonat de litiu; 5) spălare bună cu apă de robinet; 6) diferențiere cu alaun de fier 4%, până când substanța cenușie începe să apară clară; 7) spălare cu apă distilată; 8) diferențiere cu lichidul Weigert (borax 2 g, ferocianură de potasiu 2,5 g, apă distilată 200 cc); 9) după spălare, cupele sunt trecute printr'o apă alcalinizată cu câteva picături de amoniac. Deshidratare, xilen, montare în balsam.

Rezultate: nucleii apar în negru, mielina în negru.

§ 629. — **Hematoxilina Delafield** se prepară prin disolvarea a 4 g hematoxilină în 25 g alcool absolut. Se complectează apoi până la 400 cc cu o soluție apoasă saturată de alaun amoniacal (40 g alaun amoniacal la 400 cc apă distilată). După 2—3 zile, în care soluția a fost lăsată descoperită la lumină, se filtrează și se adaugă câte 100 cc de glicerină și alcool metilic. După câteva zile se filtrează din nou. Soluția este foarte durabilă.

Colorația: durează între 4—24 de ore într'o soluție diluată din soluția-mamă. Obișnuit se colorează 4—5 ore într'o soluție diluată în proporție de 0,5 cc soluție-mamă la 50 cc apă distilată. Se spală apoi cu apă de robinet.

§ 630. — **Hematoxilina Papanicolau** pentru frotiuri. Se prepară mai întâi o soluție mamă astfel: 1) se disolvă 20 g alaun amoniacal în apă distilată caldă 200 cc; 2) se disolvă totodată 1 g hematoxilină în 10 cc alcool absolut; 3) se amestecă cele două soluții și se lasă să fiarbă câteva secunde; 4) se retrage flacăra și se adaugă 0,5 g oxid galben de mercur, soluția devenind în acest moment purpurie-neagră; 5) se răcește, lăsând să curgă un curent de apă rece pe vas; 6) când soluția este perfect răcită se adaugă 8 cc de acid acetic glacial.

Soluția aceasta de hematoxilină este foarte stabilă.

Soluția colorantă se obține amestecând două părți din soluția-mamă cu o parte din soluția de alaun amoniacal saturată (15 g alaun

amoniacal şi 4 cc acid acetic se disolvă în 100 cc apă distilată) care conţine totdeauna un exces de cristale de alaun amoniacal.

Soluţia colorantă nu este stabilă timp îndelungat, trebuieşte întrebuinţată înainte de întrebuinţare.

Colorarea în soluţia de hematoxilină durează 5—10 minute. Diferenţiere cu apă acidulată 0,5% cu acid clorhidric. Apoi virare în apă litinată.

Tehnica complectă a colorării frotiurilor vezi § 668.

ALŢI COLORANŢI NUCLEARI

§ 631. — **Tionina** (clorhidrat de amidodifeniltiazină) este un colorant preţios datorită electivităţii sale pentru nuclei şi datorită proprietăţilor metacromatice. Colorant sintetic. Coloraţiile cu tionină prezintă desavantajul de a nu se conserva mult timp, dispărând îndeosebi metacromazia.

Soluţia apoasă de tionină se prepară prin disvolvarea a 1 g tionină în 100 cc apă distilată. Pentru colorarea nucleilor se colorează secţiunile timp de câteva minute.

Diferenţierea se face cu apă simplă sau, pentru o mai bună conservare a preparatelor, Masson recomandă diferenţierea cu apă acidulată $1^0/_{00}$ cu acid acetic. Deshidratare rapidă, montare.

Cromatina se colorează în albastru-violet, celelalte componente celulare sau extracelulare colorându-se metacromatic.

§ 632. — Cu rezultate mult mai bune se foloseşte o soluţie hidroalcoolică de tionină sau chiar mai bine soluţia fenolată după formula următoare: soluţie saturată de tionină în alcool 60° 1 parte, apă fenolată 2% 4 părţi. Colorarea pentru nuclei durează câteva minute. Diferenţiere ca mai sus. Deshidratare, montare în balsam.

§ 633. — **Albastrul de toluidină**, colorant apropiat de tionină şi albastru de metilen; se foloseşte sub forma de clorhidrat. Este un colorant metacromatic, indiferent de reacţia soluţiei. Se prepară soluţia din toluidină 1 g, apă 100 cc, acid acetic 1 cc. Colorarea nucleilor durează câteva minute până la câteva ore, în funcţie de scopul urmărit de a colora numai nucleii sau şi compuşii nucleoprotidici. După colorare, diferenţiere cu apă acidulată $1^0/_{00}$ cu acid acetic. Deshidratare rapidă, montare în balsam. Coloraţie metacromatică, nucleii apar în albastru.

§ 534. — **Albastrul de metilen** (clorhidrat de tetrametiltionină) este unul din coloranţii cu largă întrebuinţare. Nu este un colorant metacromatic în stare pură, ci numai din momentul când în soluţie se formează azurul de metilen. Azurul de metilen se formează în mod spontan în soluţiile de albastru de metilen şi în mod constant după învechirea soluţiei. Albastrul de metilen poate fi folosit ca un colorant nuclear

în soluţie apoasă 1 g%. Colorarea durează un minut. Soluţiile pure colorează nucleii în albastru.

Albastrul de metilen îşi găseşte indicaţia majoră în coloraţiile vitale şi supravitale şi în coloraţii speciale pentru sistemul nervos.

§ 635. — **Azurul de metilen** este încă neelucidat din punct de vedere chimic, fiind unul din corpii care se formează în soluţiile vechi de albastru de metilen şi care imprimă caractere noi, metacromatice, acestei soluţii colorante. El este un produs de oxidare al albastrului de metilen. El se formează şi în cursul combinării albastrului de metilen cu eozina. Azurul de metilen în stare pură, deasemenea, nu este un colorant metacromatic, el colorînd în albastru cromatina. Dar, în soluţii complexe în care se găseşte un colorant acid cum este eozina, el favorizează fixarea acesteia pe cromatină, fenomen care în mod spontan nu ar avea loc. Se pare deci că ar acţiona ca un mordant.

Pentru a obţine o soluţie de albastru de metilen bogată în azur de metilen se tratează această soluţie la cald cu borat de sodiu, carbonat de litiu sau de sodiu şi, în general, prin acţiunea alcalinelor asupra soluţiilor vechi.

§ 636. — **Coloraţia cu Kernechtrot** este cea mai recomandabilă pentru colorarea în roşu a nucleilor. Este preferabilă coloraţiilor cu carmin pentru simplitatea şi precizia rezultatelor pe care le dă. Fixarea pieselor este preferabil să se facă în amestecuri cu sublimat. Prepararea soluţiei: se disolvă la cald 0,1 g Kernechtrot în 100 cc soluţie apoasă 5% de sulfat de aluminiu. Răcire. Filtrare.

Secţiunile sunt colorate 5—10 minute sau mai mult în această soluţie.

Coloraţia nucleilor cu Kernechtrot dă rezultate excelente în coloraţiile pentru fier, coloraţii după Gram, colorarea ţesutului conjunctiv, metoda Mallory, colorarea ţesutului elastic cu rezorcin-fuxină. Coloraţiile de fond se fac cu albastru de anilină, verde lumină, etc.

§ 637. — **Safranina** este un colorant nuclear preţios pentru preparatele fixate în lichide fixatoare cu crom sau osmiu. Un rezultat bun depinde de folosirea unui bun colorant, deaceea unii propun să nu se folosească decât safranină proaspătă şi de bună calitate.

Prepararea soluţiei: se disolvă la cald 10 g safranină G. extra în 155 cc alcool 95° şi 145 cc apă distilată. Această soluţie-mamă este folosibilă mult timp, după unii fiind chiar mai bună prin maturarea ei. Pentru colorare se amestecă 20 cc soluţie-mamă cu 80 cc alcool 50°.

Secţiunile trebue colorate 24 de ore, spălate rapid cu apă distilată şi apoi diferenţiate în alcool absolut. Pentru o diferenţiere mai rapidă se foloseşte alcool acidulat $1^0/_{00}$ cu acid clorhidric.

Rezultate: cromatina se colorează în roşu-intens, mai ales pe piesele fixate în soluţii cu săruri de osmiu.

§ 638. — Babeş recomandă o soluţie apoasă de *anilină şi safranină*.

Preparare: se [illegible] de anilină, 2—3 g de safranină. Se filtrează. Soluția [illegible] o lună. Colorare 10—20 de minute până la câteva ore.

§ 639. — Pappenheim recomandă verdele de metil (colorant bazic) ca un colorant electiv pentru cromatină, care nu colorează niciun alt substrat oxifil sau bazofil. Preparare: se disolvă 1 g verde de metil în 100 cc apă distilată. Se adaugă apoi 25 cc alcool absolut.

Colorarea cu această soluție durează 10 minute. Pentru o colorare mai îndelungată, soluția trebue diluată în părți egale sau mai mult cu alcool 20°. Diferențiere cu alcool 70° timp de 1—2 minute, apoi alcool absolut 1 minut. Urmează xilen, montare în balsam sau ulei de cedru. Colorația nu este durabilă.

Deoarece verdele de metil este foarte sensibil la alcaline, trebue să fie complect neutralizate sau ușor acidulate toate lichidele și soluțiile care vin în contact cu preparatul.

§ 640. — **Colorația verde de metil-pironină** se face cu soluția următoare: verde de metil 00 cristalizat-gălbui 0,15 g; pironină 0,25 g; alcool 96° 2,5 cc; glicerină 20 cc; apă fenolată 0,5 % q. s. 100 cc. Colorare 20 de minute. Spălare rapidă în apă. Diferențiere rapidă și deshidratare în alcool absolut. Ulei bergamote sau xilen, balsam.

Rezultate: cromatina (nucleoproteide) în verde; toate celelalte componente se colorează în diferite nuanțe de roșu.

Pentru reușita colorației, piesele trebue fixate în alcool absolut sau fixator Carnoy și incluse în parafină sau celoidină.

Colorația reușește adesea și după fixatorii Helly, Orth sau Regaud.

§ 641. — **Colorarea nucleilor cu naftazarină.** Naftazarina colorează nucleii în albastru. Prepararea soluției: se disolvă, încălzind la fierbere, 0,1 g naftazarină și 5 g clorură de aluminiu chimic pură în 100 cc apă distilată timp de 5—10 minute. După răcire se filtrează. Se repetă filtrarea după 8 zile. Se adaugă timol pentru conservare.

Secțiunile la ghiață se colorează cufundându-le în soluția de colorant timp de 10—15 minute. Secțiunile dela parafină sunt colorate timp de 1—24 de ore (nu se supracolorează). Apoi se spală la apă distilată și se colorează fondul cu eozină.

§ 642. — Se recomandă o colorație combinată din naftazarină-azofloxină, care ar depăși calitativ colorația clasică hematoxilină-eozină.

Se recomandă folosirea a două soluții. Sol. A: 0,25 g naftazarină, 5 g clorură de aluminiu. Se disolvă în 100 cc apă distilată, încălzind la fierbere timp de 5—10 minute. Se filtrează după răcire. Sol. B: o soluție apoasă de azofloxină 1‰. Cele două soluții se amestecă înainte de întrebuințare în proporția de 3 părți sol. A și 1 parte sol. B. Se filtrează înainte de întrebuințare. Se vor folosi numai amestecuri proaspete.

Colorare. Secțiunile la ghiață se colorează timp de 10—15 minute, iar cele la parafină timp de 20—30 minute. Spălare în apă. Montare cu alcool, xilen, balsam.

364

Metoda prezintă avantajul de a colora simultan atât nucleii, cât și citoplasma. Nucleii se colorează în albastru, citoplasma în roșu, iar sângele în roșu-strălucitor. Colorația rezistă foarte bine la lumină.

CITOLOGIA

§ 643. — Citoplasma este un element principal de constituție al celulei, tot atât de important ca și nucleul. Ea reprezintă, în majoritatea cazurilor, partea cea mai mare din volumul celular. Constituția chimică exactă a citoplasmei nu este încă cunoscută; din cercetările de până acum reiese că ea este o soluție apoasă coloidală de proteine, lipide, glucide și săruri anorganice, combinate în diverse feluri, combinații care pot varia într'un sens sau altul în timpul vieții celulare. Structura optică a citoplasmei observată în timpul vieții celulare e fin granulară. Autorii mai vechi emiseseră diverse teorii asupra structurii citoplasmei; sunt bine cunoscute cele patru teorii: alveolară, reticulară, fibrilară și granulară. Aceste aspecte se datorează în realitate coagulării proteinelor produse de diverși agenți fixatori, sunt deci artefacte de tehnică.

In substanța fundamentală a citoplasmei se găsesc o sumă de constituenți celulari care se clasifică astfel:

α) organite celulare: condriom, aparat Golgi, centrioli, fibrile: tonofibrile, neurofibrile, miofibrile;

β) incluzii: acumulări de proteine, grăsimi, glucide; pigmenți, granule de secreție, substanță cromofilă, cristale. In celulele în diferitele faze ale diviziunii se pot vedea cromozomii în massa citoplasmică.

Din punct de vedere tinctorial, citoplasma are afinitate pentru coloranții acizi.

METODE DE COLORARE A CITOPLASMEI

§ 644. — In cele ce urmează ne vom ocupa de o întreagă serie de coloranți plasmatici care se întrebuințează în tehnica histopatologică, fie ca soluții simple, fie ca amestecuri colorante.

Am socotit necesar să întrebuințăm la fiecare colorant în parte numele cel mai uzual sub care este cunoscut. Acolo unde ne-a fost posibil, numele este urmat și de sinonime; totodată am socotit necesar să dăm formula chimică, pentru a putea astfel ilustra strânsa interdependență dintre constituția chimică și proprietățile tinctoriale.

§ 645. — **Acid picric**, acid picronitric, trinitrofenol. Solubilitatea la 26°: în apă = 1,18%, în alcool = 8,96 %. Intrebuințat în special ca fixator, dar și colorant citoplasmic în amestecuri (picrofuxina, picro-indigocarmin).

Observații. Trebue atrasă atenția asupra faptului că acidul picric diferențiază colorațiile cu hematoxilină și că deci, când urmează un amestec picric, nucleii trebue supracolorați.

Nu încălziți soluțiile de acid picric! Pot exploda!.

§ 646. — Albastru de anilină (Bleu Lumière, Bleu à l'eau, Bleu de China, Bleu Cotton, Anilinblau, Bleu de Metyl), trifenilrosanilină sulfonată. Important colorant acid, electiv pentru țesutul colagen, în special în amestecuri de tip Masson, Azan, Mallory. După fixare în formol sau fără a mordansa în prealabil cu acid fosfomolibdic secțiunile, albastrul de anilină este neelectiv.

Soluție uzuală. Soluția apoasă saturată în apă distilată conținând 2,5 % acid acetic (Masson). *Timp mediu de colorare*: 3—5 minute.

Observații. In soluțiile apoase colonizează destul de ușor diverse ciuperci, care schimbă pH-ul și deci proprietățile colorante ale albastrului. Soluția degradată de ciuperci are în ea porțiuni gelatinoase de aceeași culoare (albastre).

§ 647. — Aurantia (galben imperial), hexanitrodifenilamina. E un colorant acid întrebuințat în metode citologice drept colorant de contrast al citoplasmei. *Soluție uzuală*: 0,5 g % în alcool 70°. *Timp mediu de colorare*: 30 de secunde.

§ 648. — Benzopurpurina (roșu diamin 4 B). Colorant tetrazoic derivat din benzidină. E un colorant citoplasmic de contrast după colorații nucleare de hematoxilină. Soluție uzuală: 1 g % în sol. acid tanic 5%. *Timp de colorare*: 10—20 de minute.

§ 649. — Roșu Congo. Colorant tetrazoic derivat din benzidină. E un colorant citoplasmic de contrast. Virează în albastru în prezența acizilor. *Soluție uzuală*: sol. 0,5 g % apoasă. *Timp mediu de colorare*: 5 minute.

§ 650. — Cromotrop 2 R. Colorant oxiazoic rezultat din combinarea diazobenzenului cu acidul cromotropic. E un colorant citoplasmic de contrast care se întrebuințează după fixare în amestecuri fixatoare cu bicromat sau acid cromic. *Soluții uzuale*: soluție apoasă acetifiată sau mai bine soluție alcoolică concentrată.

§ 651. — Eozina (fluoresceină bromată) solubilă în apă. Există și o eozină zisă B.A. (etil-eozina), solubilă în alcool (1,13 g %).

Colorant plasmatic întrebuințat curent pentru fond, mai ales după hematoxilină. Eozina este întrebuințată în amestecuri cu coloranți bazici (albastru de metilen) cu care dă eozinați, folosiți la colorarea sângelui. Soluțiile apoase slabe 1/1 000 — 1/10 000 colorează mai încet (12—24 de ore), însă foarte electiv. Soluțiile apoase curent întrebuințate (0,5—1 %) colorează în 1—2 minute. Supracolorarea cu eozină se poate diferenția cu apă de robinet și cu alcool.

§ 652. — O formulă recomandată și încercată este următoarea: se fierb într'un balon în 100 cc alcool 70 % 1 g eozină apoasă (gălbuie), 1 g eozină alcoolică și 0,25 oranj G. La fierbere se adaugă 1 cc acid clorhidric oficinal și după răcire 20 cc soluție apoasă saturată de carbonat de litiu. Filtrare.

§ 653. — Eritrozina sau iodeozina este fluoresceina tetraiodată. Soluția apoasă 1 % se folosește pentru colorarea citoplasmei în locul eozinei și în colorații complexe.

§ 654. — Coloratia complexă cu hematoxilină-eozină este cea mai curent întrebuințată în histopatologie, deși nu este electivă, eozina acoperind întreg fondul. Ea se pretează la orice metodă de fixare sau includere și permite obținerea microfotografiilor fără mari complicații tehnice.

După colorarea nucleilor cu hematoxilină, secțiunile se trec din apă în eozină pentru 1—2 minute, se spală apoi cu apă, se diferențiază eventual cu alcool în cursul deshidratării, se clarifică și se montează în balsam.

§ 655. — Drept colorant de contrast după hematoxilină se mai folosește un amestec de 80 părți soluție saturată de eritrozină în apă tamponată la pH = 4,62 și 20 părți soluție saturată de oranj G în apă tamponată la pH = 4,62.

§ 656. — Tamponul de acetat standard pentru pH = 4,62 se prepară din 50 cc NaOH n/1,100 cc acid acetic glacial și 350 apă distilată.

§ 657. — Fuxina acidă (Säurefuxin, Rubin S, Magenta Acide), pararosani ină sulfonată. Colorant plasmatic important care se întrebuințează în special sub formă de amestecuri. *Soluție uzuală*: (Masson) 1/200 în apă acetifiată 1 %. *Soluția van Gieson*: soluție de fuxină acidă 1 % 10 cc, soluție apoasă saturată de acid picric 100 cc.

Observație. Fuxina acidă, ca și alți coloranți acizi (oranj G), în cantitate de 1 g în soluția acid tanic 33 %, constitue așa numita « tanin-fuxină » (respectiv « tanin-oranj ») care are proprietatea de a diferenția colorații albaștri bazici, extrăgându-i din citoplasmă.

§ 658. — Floxina. E o fluoresceină colorată. Colorant citoplasmatic asemănător eozinei, care însă colorează granulațiile mult mai strălucitor.

§ 659. — Galben metanil. Colorant oxiazoic: sarea de sodiu a acidului metaamidobenzensulfonic. In soluție apoasă, virează în roșu în soluțiile acidificate și își revine prin alcalinizare la culoarea galbenă. *Soluție uzuală*: soluție apoasă 0,05 % la care se adaugă II picături de acid acetic. *Timp de colorare*: 3—5 minute.

§ 660. — Oranj G. Colorant oxiazoic: sare de sodiu a acidului sulfonic al benzenazonaftolului. Solubilitate la 26° în apă 10,86 g %, în alcool 0,22 g % Colorant de contrast electiv după hematoxilină. Deasemenea întrebuințat în amestecurile Mallory, azan sau ca diferențiator în metoda cu safranină — violet de gențiană — oranj. Ca și fuxina, dă cu acidul tanic în soluție concentrată « tanin-oranj » care diferențiază coloranții bazici.

§ 661. — Ponceau (ponceau R, ponceau de xylidine). E un colorant oxiazoic derivat al acidului naftoldisulfonic. Se întrebuințează în metoda

tricromică Masson drept colorant citoplasmic. *Soluție uzuală*: soluție apoasă 1 % cu acid acetic 1 cc. *Timp de colorare*: 5 minute.

§ 662. — **Verde lumină** (Lichtgrün, Vert acide rapide N, Vert Lumiére). Derivat de rosanilină. Solubilitatea la 26°: în apă 20,35 g %, în alcool 0,82 g %. Colorant de contrast al citoplasmei după safranină; deasemenea întrebuințat ca variantă în colorarea colagenului în metoda tricromă Masson.

Amestecuri colorante ale citoplasmei

§ 663. — **Metoda cu picro-indigo-carmin.** 1) După colorare nucleară cu carmalaun; 2) se colorează 5—10 minute în amestecul: sol. apoasă saturată de acid picric 100 cc, indigo carmin 0,25 g; 3) spălare în apă acetifiată, apoi în apă de robinet; 4) uscare cu o hârtie sugativă; 5) trecere în alcool absolut pentru a scoate excesul de acid picric; 6) xilen, balsam.

§ 664. — În loc de colorare cu eozină, după colorarea nucleilor cu hemalaun, se poate utiliza amestecul: fuxină acidă 1 g, oranj G 6 g, alcool 90° 60 cc, apă distilată 240 cc.

§ 665. — 1) După colorarea nucleilor, citoplasmele se pot 2) colora în amestecul: soluție alcoolică saturată de eozină, soluție alcoolică saturată de verde lumină āā. *Timp de colorare*: 5 minute; 3) secțiunile scoase din colorant sunt roz; 4) diferențiere în alcool acetificat 5 % până ce țesutul conjunctiv apare verde; 5) toluen-balsam.

§ 666. — **Metoda Minchin cu verde lumină acid picric**: 1) colorare nucleară cu carmin sau safranină; 2) colorare de contrast în amestecul: verde lumină 1 g, acid picric 0,5 g, alcool 90° 100 cc.

§ 667. — **Colorația pentru mucus** (mucicarminul lui Mayer). Prepararea soluției: se amestecă într'o capsulă carmin 1 g, clorură de aluminiu 0,5 g și apă distilată 2 cc. Se încălzește la flacără mică timp de două minute. Lichidul devine siropos și de un roșu aproape negru. Se varsă apoi conținutul capsulei într'un recipient conținând 100 cc alcool de 50 %. Se lasă 24 de ore și se filtrează.

Colorare: 1) secțiunile deparafinate se colorează puternic cu hemalaun; 2) fără să se diferențieze, se spală cu apă de robinet; 3) se colorează timp de 3—5 minute cu soluția: galben metanil 0,50 g, apă acetificată 1/500 100 cc; 4) se spală cu apă distilată; 5) se colorează cu soluția de mucicarmin diluată (1 parte soluție concentrată la 9 părți apă distilată); 6) se spală cu apă, alcool de 95%, alcool absolut, xilen, balsam.

Rezultate: mucusul apare colorat în roșu, nucleii în negru.

§ 668. — **Colorația Papanicolau** pentru frotiuri vaginale. 1) Frotiurile sunt fixate în alcool-eter āā, după care sunt trecute succesiv prin alcool de 70%, apoi de 50%, în apă distilată. 2) Se trec apoi

în colorantul cu hematoxilină timp de 5—10 minute. Se spală cu apă distilată, apoi se cufundă lamele odată sau de două ori într'o soluție apoasă de HCl 0,5%. Se spală cu apă și se trec apoi într'o soluție slabă de carbonat de litiu. Spălare. 3) Se trec apoi frotiurile prin alcooluri succesiv de 50%, 70%, 80%, 90%, deshidratându-le. 4) Se colorează 3—4 minute cu soluția de oranj G (oranj G soluție 0,5% în alcool de 95% 100 cc, acid fosfotungstic 0,015 g). 5) Excesul de colorant este îndepărtat cu alcool de 70%. 6) Frotiurile sunt apoi colorate cu soluția E A 31 timp de 10—15 minute (verde lumină, soluție 0,5% în alcool de 95% 50 cc, brun Bismarck, soluție 0,5% în alcool de 95% 8 cc, eozină galbenă, soluție 0,5% în alcool de 95% 42 cc, acid fosfotungstic 0,140 g, carbonat de litiu I pic.). 7) Se spală apoi frotiurile în alcool de 95%, alcool absolut, xilen. Montare cu balsam de Canada.

CONDRIOMUL

§ 669. — În citologie se dă numele de «condriom» unor organite intracitoplasmice cu aspect de granulații, bastonașe sau filamente. Aceste elemente sunt constituite chimic din proteine și o mică cantitate de lipide. Părerea unor autori, că elementele condriomului ar fi constituite exclusiv din lipoizi, se bazează pe interpretarea greșită ce s'a dat colorării lor în negru de către acidul osmic. Elementele condriomului erau socotite mai demult ca artefacte de tehnică. Acest lucru a fost infirmat prin studiul condriomului colorat prin coloranți vitali.

§ 670. — Condriomul se pune în evidență numai în țesuturile recoltate pe viu.

§ 671. — Atunci când întrebuințăm tehnicile speciale pentru colorarea condriomului, trebue să ținem seama de unii factori care pot influența reușita metodelor:

a) Pentru a putea obține preparate corecte trebue să ne situăm de fiecare dată în aceleași condiții de experiență în ceeace privește animalul utilizat: vârsta, condițiile de trai, hrana, epoca anului; condriomul sau granulele de secreție se pun greu în evidență la animalul în inaniție, aspectul gonadelor va fi altul în perioada de rut sau cea de liniște, etc., etc.

b) Este de dorit ca la sacrificarea animalului să nu intervină anestezice sau toxice (gaz de luminat, etc.) care pot schimba complect aspectul organitelor celulare.

c) Intrucât întrebuințăm fixatori cu putere de pătrundere mică, este indispensabil ca fragmentele de organ recoltate să fie mici (de ex.: 2 × 2 × 2 mm); cu toate acestea, periferia pieselor este suprafixată.

d) Vase chimic curate, reactivi puri, observarea riguroasă a timpilor tehnici.

§ 672. — Agenţii fixatori ai condriomului se pot clasifica în trei grupe:

α) *oxidanţi*: acid cromic, acid osmic, bicromat de potasiu;

β) *săruri ale metalelor grele*: mercur, uraniu, cupru, molibden, platină, care precipită fosfatidele şi acizii graşi;

γ) *formol* care precipită complexele fosfatidelor şi acizilor graşi cu proteinele.

Amestecurile fixatoare care dau rezultatele cele mai frumoase sunt incontestabil cele osmice (în special Benoit), sunt însă foarte scumpe. Rezultate bune se pot obţine şi prin amestecurile fără acid osmic, în special cu lichidul Ţupa.

Se folosesc în acest scop:

§ 673. — **Amestecul fixator Benoit**, recomandat pentru condriom, conţine: acid osmic 2% 5 cc, bicromat de potasiu 5% 6 cc, $HgCl_2$ (sublimat) 5% în soluţie clorurată izotonică 5 cc, nitrat de uran 4% 4 cc. Fixare de preferinţă la răcitor la + 6 — 8°. Timp de fixare optim: 24—48 de ore.

§ 674. — **Lichid Flemming tare** (acid cromic 1% 15 cc, acid osmic 2% 4 cc, acid acetic cristalizat II—III pic. Timp optim de fixare: 24 de ore. Se colorează apoi cu hematoxilină ferică. Pentru a colora cu metoda Altmann este necesară postcromizarea.

§ 675. — **Fixatorul Benda** (acid cromic 1% 15 cc, acid osmic 2% 4 cc, acid acetic II—III pic.). Timp optim de fixare 8 zile. Spălare în apă distilată 1 oră. Trecere în acid pirolignos rectificat şi acid cromic 1% aa timp de 24 de ore, clătire în apă distilată. Trecere în bicromat de potasiu 2% 1—3 zile. Spălare în apă curgătoare 24 de ore — alcooluri — includere.

§ 676. — **Fixatorul Meves.** Acid cromic 0,5% (în soluţie salină fiziologică 15 cc, acid osmic 2% 4 cc, acid acetic III pic.). Timp optim de fixare: 1—8 zile. Acest amestec se întrebuinţează pentru material embrionar.

§ 677. — **Fixatorul Champy** (§ 253). Timp optim de fixare: 24—48 de ore. Postcromare ca în metoda Benda sau Regaud.

§ 678. — **Fixatorul Regaud** (§ 255). Timp de fixare optim: 3—4 zile. Fixatorul se înlocueşte zilnic cu fixator proaspăt. Postcromizare 3—8 zile în bicromat de potasiu 3%. Ţupa adaugă la fixator 1 g de nitrat de uraniu. Această metodă, urmată de o colorare cu hematoxilină ferică, dă rezultatele cele mai sigure.

§ 679. — **Metoda Kruszinsky.** Fixare în amestec Cajal (nitrat de uraniu 1 g, formol neutru 15 cc, apă distilată 85 cc). Timp optim de fixare: 10—24 de ore. Clătire rapidă cu apă distilată. Cromare în bicromat de potasiu 3% timp de 1—3 zile. Spălare în apă curentă, alcooluri, incluzie la parafină. Se pot colora cu hematoxilină ferică, dar se poate face şi o colorare după Altmann. Această metodă, destul de simplă, dă şi ea rezultate frumoase.

§ 680. — **Metoda Kiyono.** Fixare în formol sau Helly 24 de ore. Spălare. Cromare 48 de ore la 37° în: bicromat de potasiu 5 g, alaun de crom 2 g, apă distilată 100 g. Spălare 24 de ore, includere.

Cu această metodă se pot fixa şi piese mai mari şi se poate colora şi cu metoda Altmann.

§ 681. — **Mordansarea.** Fixatorii condriomului sunt în general defavorabili colorării ulterioare. Pentru a corecta acest neajuns se obişnueşte să se mordanseze piesele. Sunt trei modalităţi de mordansare:

§ 682. — **Suprafixarea** în amestecurile osmice pe un timp de circa 48 de ore; operaţia este fără risc, deoarece se poate corecta prin albirea secţiunilor după includere.

§ 683. — **Postcromizarea** se face în soluţii apoase de bicromat de potasiu de diverse concentraţii, la rece sau mai bine la cald (37°) pentru un timp care variază între 12 şi 72 de ore.

După fixare în Champy sau Zenker fără acid acetic, şi includere la parafină, se colodionează secţiunile şi se mordansează pe lamă timp de 24—48 de ore în soluţia: alaun de crom 10 g, alaun de fier 10 g, bicromat de potasiu 10 g, apă distilată 100 cc.

§ 684. — După fixare în formol neutru sărat se mordansează în lichidul: biacetat de mercur 3 g, acid acetic 0,1 cc, apă distilată 100 cc. Acest procedeu este avantajos pentru piesele bogate în ţesut conjunctiv sau în lipide şi care ar deveni dure şi sfărâmicioase după mordansarea în bicromat. El permite să se obţină secţiuni fine.

§ 685. — **Includerea.** Pentru studiul condriomului este preferabil ca piesele să fie incluse în parafină, pentru a putea obţine secţiuni subţiri de 2—5 microni. In secţiunile mai groase, suprapunerea de elemente e atât de mare, încât ele nu se mai pot studia. Autorii clasici sunt de părere că este avantajos să se evite, pe cât posibil, solvenţii puternici ai grăsimilor (benzen-toluen-xilen). In acest scop s'a propus o schemă de includere cu esenţă de cedru.

§ 686. — Deoarece esenţa de cedru se găseşte mai greu şi e mai scumpă, noi întrebuinţăm cu rezultate bune următorul procedeu: 1) fixare în Regaud 24—48 de ore la rece (5—6°); 2) postcromizare fără a spăla în soluţie apoasă saturată de bicromat de potasiu, la 37°, timp de 12—48 de ore; 3) spălare în apă curgătoare: 12—16 ore; 4) clarificare: alcool 15° 10′, alcool 40° 15′, alcool 50° 15′, alcool 70° 30′, alcool 90° 60′, alcool absolut 2 ore (se schimbă odată), xilen 2 ore (se schimbă odată), xilen-parafină moale 2 ore, parafină tare 2 ore (se schimbă de două ori). Blocuri.

§ 687. — Pentru a obţine cât mai repede secţiuni pentru necesităţi de diagnostic, Papahagi şi Iliescu au propus o tehnică rapidă cu secţionare la ghiaţă (comunicare la Soc. de Morfologie): 1) fixare în Ţupa (piese mici 24 de ore, piese mari 48 de ore); 2) fără spălare în

soluție apoasă saturată de bicromat de potasiu la 37°. Timp: 24—48 de ore; 3) secționare la ghiață fără a spăla. Secțiunile se prind în apă. Se trec în alcool 50° și se lipesc pe lamă după tehnica lui Anicicov (vezi mai jos); 4) apă distilată 1'; 5) alaun de fier 5% la 56° 2—4 ore; 6) hematoxilină Regaud la 56° 2—4 ore; 7) diferențiere în alaun de fier 1,5% proaspăt (cristale violete, nu praf), câteva minute sub controlul microscopului, spălare, eventual supracolorare în eritrozină 1 ‰.

§ 688. — Lipirea pe lamă a secțiunilor obținute la microtomul de ghiață, după Anicicov, se face astfel: secțiunile aflate în alcool 50° se pescuesc pe o lamă, însă cu albumină Mayer. Se scurge alcoolul, se presează cu o hârtie de filtru. Se trece 30 de secunde în alcool absolut, pentru a coagula albumina, eventual se colodionează, alcool 70°, apă. Avantajul este că secțiunile se manipulează mai ușor, ca niște simple secțiuni deparafinate, reducând astfel șansele de rupere sau degradare.

§ 689. — După suprafixare în amestecuri osmice, condriomul se colorează mai ușor și mai puternic dacă se albesc secțiunile deparafinate, cu:

a) hipermanganat de potasiu 0,25% 4', sulfit de potasiu 1%, acid oxalic āā, 4'. Spălare foarte bună în apă curentă;

b) hipermanganat de potasiu 1% 30 secunde, acid oxalic 5% 30 secunde. Spălare foarte bună.

Mecanismul acestor procedee constă în reoxidarea acidului osmic care devine din nou solubil și iese din citoplasmă.

§ 690. — **Colorarea.** Cea mai sigură metodă și care permite și păstrarea îndelungată a preparatelor este cu metoda Regaud; cea mai frumoasă, dar și cea mai dificilă, este metoda Benda. Pentru reușita colorării este absolut necesar să se observe riguros timpii metodelor și să se includă la parafină pentru a se obține secțiuni subțiri între 2—5 μ.

§ 691. — **Colorarea cu hematoxilină.** După fixare într'un amestec osmic (Benoit, Flemming fără acid acetic, Meves, Benda), se include la parafină, se secționează, se lipesc secțiunile pe lamă, se deparafinează, apoi: 1) mordansare 24 de ore în soluție de alaun de fier 4% (cristale violete); 2) scurtă spălare în apă distilată; 3) colorare 24 de ore în hematoxilină ferică Heidenhain sau hematoxilină Regaud; 4) scurtă spălare în apă distilată; 5) diferențiere în soluție slabă de alaun de fier (1—2 %); din când în când oprim diferențierea, spălând în apă distilată și examinăm la microscop, apoi, dacă rezultatul nu e satisfăcător, trecem din nou în alaun de fier.

Incălzire la 56° (sau chiar mai mult), atât soluția de alaun de fier, cât și cea de hematoxilină. Această preîncălzire scurtează timpul de ședere în soluție al secțiunilor (1/4—6 ore).

§ 692. — **Colorare după metoda Altmann:** 1) fixare 24 de ore în amestec Altmann (5 cc bicromat de potasiu 5 % și 5 cc acid osmic 2%); 2) includere lentă la parafină; 3) colorare cu fuxină anilinată Altmann

(fuxină acidă 6 g, apă anilinată saturată 100 cc). Se încălzește până iese abur, fără să fiarbă; 4) diferențiere în soluție picrică: soluție apoasă de acid picric 1 p., H_2O 2 p. (eventual încălzind cu precauție) sub controlul microscopic; 5) alcool 90° — alcool absolut — xilen.

§ 693. — Colorarea după metoda Benda: 1) fixarea 8 zile în Flemming; 2) spălare 1 oră; 3) trecere în amestec pirolignos (acid pirolignos + acid cromic 1 % āā) 24 de ore; 4) trecere direct în bicarbonat de potasiu 2 % 24 de ore; 5) spălare 24 de ore — includere la parafină — secțiuni; 6) mordansare 24 de ore în alaun de fier 4 %. Clătire cu apă distilată; 7) trecere 24 de ore în soluția de sulfalizarinat de sodiu (soluție alcoolică saturată de sulfalizarinat de sodiu 1 cc, apă distilată 80—100 cc; 8) uscare cu hârtie de filtru; 9) colorare prin încălzire în soluția (soluție saturată de cristal violet de alcool 70 % și apă anilinată āā. Se diluează cu un volum egal de apă); 10) diferențiere 1—2 minute în acid acetic 30 % (până ce nucleii apar roșietici). Spălare în apă curentă 5—10 minute, uscare cu hârtie de filtru — alcool absolut — ulei de bergamote — xilen-balsam.

Rezultate. Cromatina = roșu-brun; mitocondriile = violet.

§ 694. — O altă metodă bună este următoarea (Bensley-Cowdry): 1) fixare în Regaud; 2) secțiuni deparafinate în toluen — alcool absolut — alcool 90° câte 30 de secunde în fiecare; 3) soluție hipermanganat 1% 30 de secunde; 4) soluție de acid oxalic 5% 30 de secunde; 5) câteva treceri în apă distilată total 1 minut; 6) colorare cu fuxină Altmann, încălzire, apoi 6 minute la rece. Șterge cu o cârpă în jurul secțiunii, clătește în apă distilată așa ca să rămână doar secțiunea colorată, altfel se produc precipitate cu verdele de metil; 7) diferențiere: se pune cu pipeta puțin verde de metil 0,5 % pentru exact 10 secunde, se scurge excesul, se trece direct în alcool de 95°, se clătește în alcool absolut, xilen.

Observații. a) Verdele decolorează fuxina = mordansaj insuficient în bicromat, se omit permanganatul și acidul oxalic și se mordansează în bicromat 2%. *b)* Fuxina supracolorează = mordansaj prea lung în bicromat; se prelungesc permanganatul și acidul oxalic. *c)* Dacă culoarea verdelui e prea slabă se omite alcoolul de 95° și se deshidratează direct în alcool absolut. *Rezultate.* Nucleii în verde, condriomul în roșu.

§ 695. — **Metoda Dubreuil pentru condriomul celulelor sanguine:** 1) se ia într'o pipetă sânge, apoi se trage în pipetă acid osmic 0,5—1% într'un volum de câteva ori mai mare. Se pune într'un tub de centrifugă. Fixarea se produce în circa 1 oră; 2) după trecerea acestui timp se adaugă apă distilată, se centrifughează, se decantează apa și apoi se repetă această spălare de încă două-trei ori; 3) se agită apoi cu alcool absolut, se trece apoi într'o soluție foarte slabă de celoidină; 4) din acest amestec se pică 1 picătură pe o lamă degresată; 5) înainte de uscarea acestei « pelicule » se pune în alcool 80°; 6) se colorează cu hematoxilină ferică.

§ 696. — Pe preparatele fixate şi impregnate după anumite metode se poate vedea în citoplasmă o reţea de fibrile neregulat întreţesute care poartă numele de «aparatul lui Golgi». S'a crezul la început că acest aparat ar fi constituit din material lipoidic, însă cercetările mai recente au arătat că fenomenul de colorare al aparatului Golgi de către acidul osmic nu se datoreşte conţinutului în lipide, ci depinde de factori fizici, condiţionând timpul şi viteza de pătrundere. In celulele observate în stare vie sau după colorare vitală cu roşu neutru se poate observa în regiunea aparatului Golgi o reţea canaliculară (descrisă de Holmgren) sau un aparat vacuolar (vacuomul). Asupra suprapunerii sau identităţii acestor trei aparate, cercetătorii nu s'au pus încă complect de acord.

§ 697. — In ce priveşte tehnica propriu zisă, sunt şi aci, ca la condriom, o serie de recomandări speciale, şi anume:

— Fixare la temperatură joasă 6—8°, iar spălarea după fixare trebue să se facă tot la temperatură joasă.

— Evitaţi narcoza animalului.

— Pentru tehnicile Colacev-Kopsch este necesară o spălare rapidă prealabilă a organului în apă distilată pentru a îndepărta sângele sau limfa superficială.

— Celulele animalelor tinere se impregnează totdeauna mai bine decât cele ale celor bătrâne.

— Atenţie la lungimea spălării după fixator! Pare că e necesar să rămână puţin crom şi osmiu în ţesut, pentru succesul impregnării.

§ 698. — In general, începătorii nu trebue să renunţe prea repede la metoda Aoyama sau Da Fano, în favoarea metodelor osmice Colacev, Weigl sau altele, deoarece acestea pot să nu reuşească, cu toată aparenţa bună a preparatului: anumite specimene de tetraoxid de osmiu nu impregnează, fără să putem da o explicaţie ştiinţifică faptului.

Piesele trebue să fie mici, vasele trebue să fie chimic curate. Nu se pot supracolora preparatele osmiate dacă nu s'au albit în prealabil cu hipermanganat de potasiu sau cu apă oxigenată. Metodele pentru punerea în evidenţă a aparatului Golgi prin impregnare se împart în două grupe: *a*) cu acid osmic şi *b*) cu nitrat de argint.

§ 699. — **Metoda Colacev - Nasonov.** *Soluţii necesare.*

a) Fixator Champy la care se adaugă 2—3 pic. din soluţia 0,1 % acid pirogalic pentru 10 cc fixator. *b*) Soluţie de acid osmic 1—2 % (Nasonov fixează în lichidul următor: bicromat de potasiu 3% 2 cc, acid cromic 1% 2 cc, acid osmic 2 % 1 cc).

Tehnica de colorare: 1) fixare în Champy (se adaugă câteva picături pirogalol 0,1 % la 10 cc) 24 de ore; 2) spălare în apă curentă 6—24 de ore; 3) osmiare la 30—35° timp de 3—7 zile. După 3 zile soluţia se înnegreşte şi atunci trebue schimbată. Nasonov recomandă să se rupă zilnic mici fragmente care să se preseze între lamă şi lamelă şi să

se examineze. Când s'a ajuns la stadiul dorit, se include; 4) spălare în apă de robinet 1 oră. Trecere repede şi incluzie la parafină. Grosimea secţiunilor, după obiect, între 2 şi 5 microni.

Rezultate. Aparatul Golgi apare negru pe fond gălbui sau cenuşiu.

Observaţii. 1) E bine să se întrebuinţeze o cantitate relativ mare de fixator, de exemplu pentru 4 piese de circa 20 mm³, adică cu o latură de 1—3 mm sunt necesari 10 cc fixator; 2) când se fac studii comparative e bine să se întrebuinţeze aceeaşi metodă, aceeaşi mărime de piese, aceeaşi temperatură pentru a avea condiţii identice; 3) ţesuturile în care se evidenţiază cel mai frumos aparatul Golgi sunt: prostata, glandele traheale, ganglionul spinal şi celulele Purkinje din cerebel; 4) când osmiarea a fost prea lungă, în afară de aparatul Golgi şi condriom, se înnegreşte şi citoplasma. Kopsch o albeşte cu 2 picături de apă oxigenată 3 % pentru 5 cc apă distilată. Sunt necesare 10—60 de secunde. Dacă se ţine apa oxigenată 5 minute, se decolorează şi aparatul Golgi.

§ 700. — **Metoda Mann - Kopsch**: 1) fixare în Mann (soluţie apoasă 1 % acid osmic, soluţie saturată $HgCl_2$ în soluţie salină fiziologică aa) timp de 1/4—3 ore; 2) spălare în apă distilată câte 1/4—1/2 oră; 3) trecere în acid osmic 2 %, 10 zile la 3 săptămâni. Soluţia se pune într'un borcan cu dop şlefuit. Cantitatea de soluţie trebue să fie suficientă ca să acopere piesele. Dacă tetraoxidul de osmiu se desintegrează (devine negru) sau se evaporează (nu mai miroase), piesele se spală repede în apă distilată şi se pun în acid osmic proaspăt; 4) trecere în apă la 38° timp de 2 zile. Deshidratare — includere la parafină. Secţiuni de circa 3—6 μ. Se examinează apoi o secţiune deparafinată şi montată în balsam.

Dacă procesul de osmiare a reuşit, aparatul Golgi şi grăsimea sunt negre. Organitele nucleare, condriomul şi citoplasma sunt colorate dela galben la brun-verzui. După ce s'a studiat această secţiune netratată şi s'a notat întinderea procesului, se pot apoi utiliza următoarele procedee:

a) Se poate extrage înnegrirea în terebentină (timp dela 1/2 minut la 1/4 oră). Se mai poate utiliza şi dioxan sau soluţie de 20 părţi perhidrol cu 80 părţi alcool sau cu hipermanganat de potasiu. Dacă condriomul nu se decolorează, se fac alte secţiuni din blocuri ţinute doar 7—8 zile în acid osmic.

b) Dacă mitocondriile nu sunt colorate în negru se poate trece direct la metoda Altmann după ce s'a albit citoplasma în felul următor: secţiunile se tratează, sub microscop, cu hipermanganat de potasiu 0,125 %, până ce citoplasma devine brună-închis, însă aparatul Golgi nu a fost atins. Se spală rapid cu apă distilată. Se pune pe secţiune acid sulfuros 5—10 % care albeşte instantaneu protoplasma, iar aparatul Golgi rămâne negru. Apoi se colorează după tehnica Altmann (§ 692).

c) Se pot colora structurile nucleare cu safranină, fuxină S sau violet-cristal.

§ 701. — **Metodele cu nitrat de argint** cer observarea următoarelor reguli generale:

a) Dacă fixarea e prelungită se impregnează şi condriomul. Scurtaţi fixarea la 1—2 ore şi tăiaţi piese cât mai mici.

b) Secţiunile la ghiaţă sunt mai bune decât cele la parafină.

c) Clarificaţi preparatele în ulei de cedru sau terpineol, deoarece xilenul le face sfărâmicioase.

d) Dacă se găsesc precipitate pe secţiuni înseamnă că s'a lăsat înainte de reducere prea mult nitrat de argint pe secţiuni; preparatele sunt inutilizabile.

e) Uneori aparatul Golgi nu se impregnează; cauzele por fi formolul vechi sau prost sau un nitrat de argint vechi.

§ 702. — **Metoda Aoyama.** 1) Fixare 3—4 ore în clorură de cadmiu 1 g, formol neutru 15 cc, apă distilată 85 cc; 2) spălare rapidă de două ori în apă distilată; 3) trecere în NO_3 Ag 1,5 % la 22° timp de 10—15 ore; 4) spălare foarte rapidă de două ori în apă distilată; 5) reducere în soluţia: hidrochinonă 2 g, formol ordinar 6 cc, apă distilată 100 cc, sulfit de sodiu 0,1—0,5 g timp de 5—10 ore; 6) spălare prelungită în apă de robinet; 7) incluzie la parafină, secţiuni.

Se pot supracolora secţiunile în carmin sau hematoxilină-eozină, în toluidină 0,5% sau în amestec Mann (albastru de metileozină).

§ 703. — **Metoda Da Fano.** 1) Fixare în nitrat de cobalt 1 g, formol ordinar 15 cc, apă distilată 100 cc. Pentru piese de grosime de 2 mm fixare 8 ore; pentru ganglion spinal la şoarece sau şobolan, optim 3—4 ore; cerebel sau creier, 8—10 ore. A nu se depăşi în niciun caz 24 de ore. 2) Impregnare 24-48 de ore la întuneric, la temperatura laboratorului, în NO_3 Ag 1,5 %. Timpul optim după experienţa noastră e de 22 de ore. 3) Spălare rapidă cu apă distilată. 4) Reducere 15—24 de ore în reductorul din metoda anterioară. 5) Spălare în apă distilată. 6) Includere la parafină sau, de preferat, secţiuni la ghiaţă de 10 microni. 7) Trecere 30 de secunde în apă oxigenată 3 % din care se pune o picătură la 25 cc apă distilată. (Timpul poate varia între 10 şi 30 de secunde). 8) Spălare în apă de robinet. 9) Aurire 10 minute în soluţie 1% $AuCl_3$. 10) Trecere în tiosulfat de Na 5% 5—10 minute. 11) Spălare în apă. 12) Supracolorare cu violet-crezil soluţie apoasă 1% timp de 50 secunde—1 minut. 13) Diferenţiere în alcool 90° până la violet-palid. Alcool absolut — toluen — balsam.

Notă. Tehnica originală nu prevede decât timpii 1—6.

Cromozomii

§ 704. — Se înţeleg prin «cromozomi» un număr de bastonaşe compuse din material cromatinian şi rezultând din fragmentarea spiremului, la sfârşitului profazei unei mitoze. Se studiază cromozomii atât în celule vegetale, cât şi în celule. animale (In Laboratorul de Histologie din Bucureşti obişnuim să studiem capetele rădăcinilor de ceapă, pusă în apă 2—3 zile. Acest material foarte ieftin ne permite să obţinem aproape sigur preparate frumoase conţinând diverse figuri de mitoză). Materialul care se studiază în vederea evidenţierii cinezelor şi cromozomilor este în general destul de fragil. Aceasta explică numeroasele precauţii pe care le recomandă autorii pentru obţinerea lor.

§ 705. — **Fixare.** *Pentru celulele vegetale*, Roschin recomandă fixarea în Carnoy sau Bouin. Pentru ouăle mici (*Pulex*, *Allelobora*, *Grilotalpa*), fixarea se face după Roschin în amestecul: alcool 96° 15 cc, formol 6 cc, acid acetic 1 cc, apă distilată 30 cc.

Pentru cromozomii mamiferelor, fixatorul întrebuinţat este Allen B_{15} (§ 247). Se mai întrebuinţează şi fixatorii osmici (Flemming, Champy, etc.).

§ 706. — **Deshidratarea** şi clarificarea au o importanţă capitală pentru păstrarea detaliilor citologice fine. Astfel, pentru ouăle mici, Roschin recomandă următorul procedeu: 1) fixare în amestecul alcool-formol-acetic (vezi mai sus); 2) deshidratarea în următoarele amestecuri:

	Apă	Alcool	Alcool butiric	Fenol	Timp
I	30 %	50 %	20 %	—	1 oră
II	11 %	50 %	35 %	4 %	24 oră
III	5 %	40 %	55 %	—	1 oră
IV	—	25 %	75 %	—	1 oră
V	—	—	96 %	4 %	½ oră
VI	—	—	96 %	4 %	½ oră
VII	amestec de alcool butiric cu parafină în părţi egale, la etuvă, 12—16 oré				

3) includere în parafină; 4) secţionare. Se fac secţiuni foarte subţiri (1—5 μ). Cuţitul de microtom trebue să fie foarte bine ascuţit şi şlefuit cu roşu optic, pentrucă orice «dinte» poate produce artefacte grave.

§ 707. — **Metodele de colorare.** *Pentru cromozomii celulelor vegetale.* Se întrebuinţează hematoxilina ferică după Heidenhain. Roschin recomandă metoda cu violet de gentiană.

1) Fixare în Carnoy sau Bouin, includere, secţiuni; 2) colorare în violet de gentiană 1 % (soluţie apoasă), timp de 3—10 minute; 3) clătire cu apă; 4) trecere în lugol alcoolic: iod metalic 1 g, iodură de potasiu 1 g, alcool 80° 100 cc timp de 30—45 de secunde; 5) alcool 95°, 2 secunde; 6) alcool absolut 2—5 secunde, toluen, balsam.

§ 708. — *Pentru cromozomii mamiferelor*, Roschin recomandă: 1) fixare în Flemming, Allen, Champy; 2) includere, secţionare, deparafinare; 3) trecerea secţiunilor în soluţia Ciur 24 de ore (soluţie apoasă

saturată de acid picric, acid acetic $\overline{aa}$); 4) spălare cu apă de robinet 1—2 ore; 5) colorare în glichemalaun Carazii, apoi în eozină.

§ 709. — Metoda cu safranină-violet de gențiană-oranj. 1) Fixare în acid cromic 1% 15 cc, acid osmic 2% 4 cc, acid acetic 1 cc, uree 0,1 g. Bucățile de organ se usucă de sânge cu o hârtie de filtru și se pun în fixator într'un volum de cinci ori atât de mare cât piesa. Timp de fixare: cel puțin 24 de ore, mai bine câteva zile. Piesele nu se strică chiar dacă se țin în fixator câteva săptămâni sau luni. E interesant că piesele incluse în parafină își pierd colorabilitatea după câtva timp. Dimensiunile obișnuite sunt de 2—3 mm. 2) Spălare 24 de ore în apă curgătoare. 3) Trecere cât mai scurtă în alcooluri de concentrații crescânde. Includere în parafină. 4) Colorarea secțiunilor deparafinate în prealabil în soluție de safranină (safranină 10 g, alcool 96° 155 cc, apă distilată 145 cc), timp de 24 de ore. Dacă după colorare secțiunile nu sunt de un roșu transparent se colorează altele, diluând soluția de safranină cu alcool de 50°. Dacă nici așa secțiunile nu prezintă un aspect frumos roșu transparent, avem de a face cu o safranină de calitate proastă. 5) Apă distilată 30 de secunde. 6) Colorare în soluție apoasă de violet de gențiană 1 % 24 de ore. Dacă secțiunile nu devin violete-închis, ci negre, se diluează colorantul. 7) Clătire de două-trei ori în apă distilată. 8) Trecere în soluție diluată de oranj G 1/2000 30 de secunde. 9) Trecere în alcool acid (3 pic. HCl la 100 alcool absolut) 2 3 secunde (maximum!). 10) Alcool absolut 30 de secunde — 1 minut. 11) Diferențiere lentă în esență de cuișoare 50 cc + 5 cc alcool absolut. Se diferențiază până ce secțiunea apare microscopic albastră în regiunile cu mulți nuclei și oranj în cele sărace în nuclei. 12) Esență de cuișoare pură pentru a scoate alcoolul din secțiuni. Se scurge bine. Se trece în toluen pentru clarificare. Balsam.

Rezultate. Citoplasma și structurile citoplasmatice apar brune-gălbui (diverse tonalități); cromatina nucleilor în liniște nucleară: albastră-închis; cromozomii și figurile de mitoză apar roșii-închis; cromatina nucleilor degenerați în liniște sau mitoză, roșie-brună-violetă; nucleolul: roșu-deschis; eritrocitele: roșii; grăsimea: neagră.

Observații. a) Cel mai important punct este concentrația optimă de oranj G. Diluția optimă trebue determinată plecând dela cea de 1/2000 în timp de 30 de secunde. Dacă culoarea galbenă e prea slabă se crește concentrația la 1/1 500—1/1 000. Dacă culoarea galbenă e prea tare se scade concentrația până la 1/5 000. Diluția astfel determinată poate fi folosită multă vreme. *b*) Cel mai bun test pentru o bună culoare de safranină este tonul roșu al eritrocitelor în preparatul terminat. *c*) Dacă în preparatul terminat, culoarea albastră a nucleilor e prea slabă, greșala constă în diferențierea prea lungă cu alcoolul acid (punctul 9).

§ 710. — Metoda Andrews pentru mitoze în celulele sarginе și măduva oaselor (după Roschin). Lama curată se trece în prealabil în vapori de acid osmic 15—20 de secunde. Se face apoi frotiul și se trece

din nou în vapori de acid osmic 15—20 de secunde, apoi se fixează în Flemming sau Allen pentru 24 de ore. Colorare în Giemsa sau hematoxilină ferică.

CENTROZOMUL

§ 711. — Este o porțiune condensată a protoplasmei; e așezat lângă nucleu și compus din două sau mai multe elemente mici numite centrioli. In momentul diviziunii celulare, centriolii se înconjoară de sfera atractivă. Acest organit celular pare să aibă un rol important în mitoză. Pentru a pune în evidență centrozomul, Roschin recomandă să se lucreze pe următoarele materiale: ouă de *Parascaris equorum* cu 12 blastomere, leucocite de *Salamandra maculosa*, spermatogonii și spermatocite dela amfibii, epiteliu intestinal dela iepure, pisică, cobai, măduva oaselor a mamiferelor (secțiuni și frotiuri), spermatocitele de *Helix Limnea* (frotiuri și secțiuni), ouă de arici de mare și ascarizi.

§ 712. — Metoda cu hematoxilină ferică. Pentru evidențierea centrozomului, fixarea se face în Flemming, Allen sau amestecuri cu sublimat. Secțiunile se colorează apoi cu hematoxilină ferică. Heidenhain colorează ușor centrozomul după fixatori cu sublimat; dacă secțiunile se colorează *înainte* de hematoxilina ferică, cu o soluție apoasă 0,1 % de Bordeaux R. La diferențierea hematoxilinei, citoplasma și nucleul se vor decolora mai repede decât centrozomul. Diferențierea este însă destul de dificilă, cu alaun de fier foarte diluat sub control microscopic făcut cu ajutorul unui obiectiv de imersie cu apă.

§ 713. — Metoda Jivago-Peșcovschi-Sapoșnicov. 1) Fixare în soluția Navașin: acid cromic 1 % 10 cc, formol 4 cc, acid acetic 1 cc, 12—24 de ore; 2) spălare 24 de ore în apă; 3) includere în parafină, secțiuni de 7—10 μ; 4) hidrolizare în acid sulfuros 30 % la 50—60° timp de 20 — 60 de minute; 5) colorare cu hematoxilină ferică, alizarină sau toluidină. Cu această metodă se colorează foarte bine filamentele fusului și centrozomii, mai slab cromozomii.

§ 714. — Metoda de mai jos utilizează secțiuni foarte fine din piese fixate în sublimat sau amestecuri osmice: se lasă peste noapte în perclorură de fier 2 %; spălare rapidă în apă distilată (2—5 minute); trecere în soluție tanin 2 % călduță; secțiunile devin negre; diferențiere în hipoclorit de calciu 2 %.

§ 715. — Metoda următoare reușește pe secțiuni din material cromat. Trecere 5 minute în soluția: iod metalic, iodură de potasiu, alcool 40° părți egale. Colorare 4 ore în soluție saturată de fuxină bazică sau safranină, în alcool de 75°. Spălare rapidă; colorare 5—15 minute în soluția: albastru de metilen 7 g, carbonat de sodiu 0,5 g, apă 100 cc; spălare rapidă. Diferențiere până la albastru-palid în oranj G la saturație în ulei de cuișoare.

Rezultate. Reticulul citoplasmic albastru pe fond portocaliu; centrozomii și nucleolii, roșii.

§ 716. — Centrozomul celulelor nervoase se pune în evidență prin următoarea metodă: 1) fixare 6—12 ore în: sublimat de saturare în formol 30 cc, acid acetic 50 cc, soluție fiziologică 15 cc; 2) trecere în alcool de 30°, apoi în alcooluri de concentrație crescândă; 3) includere la parafină; 4) colorarea secțiunilor în soluție apoasă saturată de toluidină sau tionină; 5) clarificare în xilen. Montare în balsam.

Cu această metodă s'au găsit centrozomi în celulele piramidale, în celulele lui Purkinje și în ganglionul spinal.

§ 717. — **Metoda Hortega pentru impregnarea centrozomului cu argint amoniacal**: 1) fixare în formol cel puțin 10 zile. Secționare la ghiață, spălare cu apă; 2) mordansarea secțiunilor 3 minute în soluție de acid tanic 3% la 50°; 3) spălare în soluție: apă distilată 20 cc, amoniac 4 pic., până ce secțiunile devin din nou flexibile și elastice; 4) impregnarea secțiunilor, câte 3—4 deodată, în trei vase (*A*, *B*, *C*) conținând câte 10 cc apă distilată și 12—15 picături de argint amoniacal. Se lasă secțiunile în primul vas, până ce soluția din el devine închisă la culoare, se trec apoi în baia a doua și respectiv în a treia. In această ultimă baie secțiunile trebue să aibă o culoare galbenă-închis, iar baia să rămână incoloră. Dacă e necesar se va întrebuința și o a patra baie; 5) spălare; 6) trecere în soluție de clorură de aur 1/100—1/500, apoi după virare suficientă — până la culoarea gri-roz (circa 5—10 minute); 7) se trec în soluție 5 % de tiosulfat de sodiu, câteva minute; 8) se spală bine cu apă, apoi de deshidratează și se montează.

Aspectul elementelor celulare după fixare în amestecuri osmice (după Roschin)

Metoda întrebuințată	Mitocondrii	Grăsime	Albumine	Ap. Golgi
Secțiuni montate în balsam, fără colorare	Galbene	Neagră	Galbnee până la negru	Galben sau absent
Hematoxilină ferică	Negre	Neagră	Galbene până la negru	Nu se vede în celulele somatice. In cele germinale ♂ se vede
Metoda Benda	Albastre	Neagră	Galbene până la negru	Nu se vede în celulele somatice. In cele germinalé ♂ e albastru

§ 718. — Prepararea soluției de argint amoniacal: la 30 cc de nitrat de argint 10 % se pică 40 picături de hidrat de sodiu 40 %. Se produce un precipitat negru-brun. Acesta se spală cu apă distilată de circa 10—12 ori, în care timp utilizăm circa 1 litru de apă distilată. După decantarea ultimei ape de spălare se adaugă amoniac lichid, amestecând continuu, până la disolvarea totală a precipitatului. Se va evita excesul de amoniac. Se complectează apoi cu apă distilată până la un total de 15 cc.

GRĂSIMILE, GLICOGENUL, PIGMENȚII

GRĂSIMILE

§ 719. — **Metode pentru grăsimi neutre.** *Fixarea* fragmentelor se va face numai în substanțe care nu disolvă grăsimile. Cel mai întrebuințat este formolul 10—15 %. Metodele pentru grăsimi se pot executa și cu piese fixate în alți fixatori, cu condiția ca aceștia să nu conțină disolvanți ai grăsimilor (alcool, cloroform, etc.). In prealabil se face o abundentă spălare a fragmentelor în apă curgătoare (3—24 de ore). Piesele care au fost fixate în formol se spală 15—30 de minute și se secționează la *congelație* sau se *includ în gelatină* (urmată apoi de secțiuni la congelație).

§ 720. — **Coloranții**: *Scharlach R* în amestecul: acetonă, alcool 70% câte 50 cc; Scharlach R 0,2—0,3 g. Prepararea se face la rece, apoi se ține în flacon cu dop șlefuit. Se filtrează înainte de colorație pentru evitarea cristalelor de colorant. Se păstrează bine timp de 1—2 ani.

§ 721. — **Sudan III.** In 100 cc alcool 70 % cald se pun 0,2—0,3 g Sudan III. Se amestecă de câteva ori și se pune într'un flacon închis în etuva de parafină, unde se ține câteva ore. După răcire se filtrează și poate fi utilizat îndată. Se păstrează (în flacon închis) timp de aproximativ 1 an.

§ 722. — **Albastru de Nil.** Se întrebuințează o soluție apoasă saturată.

§ 723. — **Acidul osmic** este foarte bun, însă nu poate fi utilizat frecvent din cauza prețului său urcat.

§ 724. — **Metoda de colorare cu Sudan III și Scharlach R.**: 1) Secțiunile dela congelație (din piese fixate sau din piese incluse la gelatină) se culeg în apă; 2) trecerea rapidă a secțiunilor prin alcool 50—70 % cu un ac sau o baghetă de sticlă și 3) așezarea lor în soluție Scharlach sau Sudan III într'un cristalizor acoperit, unde se țin 20—30 de minute; 4) trecerea rapidă prin alcool 50—70 % (ca la pct. 2) și se așează într'un cristalizor cu apă de izvor; 5) colorarea cu hematoxilină 3—5 minute, în așa fel încât nucleii să fie colorați intens; 6) trecerea prin carbonat de

litiu saturat (nu este obligatoriu); 7) montarea în glicerină sau gelatină. Dacă montarea se face cu glicerină se încadrează periferia lamelei cu parafină lichidă.

Rezultate. Nucleii celulelor sunt colorați în albastru-violet; grăsimile neutre în roşu-portocaliu (Sudan III) sau roşu-deschis (la Scharlach).

§ 725. — **Metoda de colorare cu albastru de Nil**: să se facă numai pe piese fixate recent în formol. La piesele fixate mult timp nu dă rezultate constante. 1) Secțiuni la congelație sau amprente pe lamă (fixate în formol); 2) colorare timp de 10—20 de minute în soluție apoasă saturată de albastru de Nil; 3) spălare în apă; 4) diferențiere în soluții 1 % acid acetic (10—20 de minute) până nu mai ies valuri de colorant din secțiuni, iar secțiunile rămân albastre clare cu nuanță omogenă. Acest timp trebue bine supraveghiat!; 5) spălare în apă schimbată de mai multe ori timp de 1—2 ore, pentru a scoate orice urmă de acid acetic; 6) montarea secțiunii pe lamă, sugativare uşoară cu hârtie de filtru curată, includere în glicerină neutră sau gelatină-glicerină (călduță — nu fierbinte!).

Rezultate. Grăsimile neutre se colorează rar; acizii graşi şi alte grăsimi prezintă nuanțe variate dela albastru la violet. Nucleii şi țesutul elastic albastru-închis. Citoplasma albastră-deschis.

§ 726. — **Metoda cu acid osmic.** Grăsimile capătă o culoare neagră prin reducerea tetraoxidului de osmiu în dioxid. Contrastul dintre grăsimi şi restul elementelor celulare este foarte evident. Această metodă se poate executa în mai multe feluri.

§ 727. — Prin fixarea inițială a fragmentelor în amestecul lui Flemming. Amestectul trebue să fie totdeauna proaspăt! 1) Fixarea fragmentelor se face în acest amestec timp de 24—48 de ore; 2) spălarea în apă curgătoare timp de 24 de ore; 3) deshidratare în alcooluri succesive; 4) clarificarea nu se face în xilen, ci în eter de petrol sau benzină curată; 5) includerea în parafină; 6) secțiuni, deparafinare şi montare în ulei de cedru după deshidratare şi clarificare. Prin metoda cu acid osmic (fixarea în amestecul Flemming), numai o parte a grăsimilor neutre se impregnează în negru dela început (« înnegrire primară »). Pentru înnegrirea tuturor grăsimilor se recomandă trecerea secțiunilor în alcool 60 — 70% timp de 24 de ore pentru « înnegrirea secundară ».

§ 728. — Prin fixarea fragmentelor în soluție de acid osmic 1% timp de 36—72 de ore. După această fixare se utilizează includerea la parafină, ca şi în metoda precedentă.

§ 729. — Fixarea fragmentelor în formol 15%, sau diverşi fixatori (Müller, Helly şi Regaud). 1) Spălarea îndelungată a fragmentelor în apă; 2) secțiuni la congelație; 3) secțiunile se pun în soluție 1% acid osmic (sau în amestecul Flemming) la întuneric timp de 24 de ore; 4) se pun apoi secțiunile în apă distilată la lumina camerei timp de 24 de ore; 5) spălare îndelungată; 6) montare în glicerină.

§ 730. — Din fragmente mici fixate 3—4 zile în amestecul Flemming se fac secțiuni la congelație. Pentru « înnegrirea secundară », secțiunile se țin 4 ore în soluție 1% acid osmic la termostat sau 24 de ore la întuneric la temperatura camerei. Se face apoi spălarea îndelungată a secțiunilor şi montarea în glicerină.

§ 731. — **Coloraţia cu clorofilă.** Se întrebuințează o soluție saturată de clorofilă în părți egale de alcool 70% şi acetonă. 1) Secțiunile la congelație se trec rapid prin alcool 70%; 2) colorare timp de 3 minute în soluție de clorofilă; 3) trecere rapidă prin alcool 70%; 4) apă de izvor, montare în glicerină.

Rezultate. Grăsimile sunt colorate în verde.

§ 732. — **Metoda Fischler** se recomandă ca fiind mai practică pentru *acizii graşi*: fragmente fixate în formol: 1) secțiunile la congelație se pun în soluție concentrată de acetat de cupru timp de 24 de ore la 37°; 2) spălarea îndelungată în mai multe cristalizoare cu apă distilată; 3) colorarea în hematoxilină preparată după Weigert 20 de minute. Prepararea soluțiilor se face în felul următor:

Soluția I: hematoxilină 1 cc, alcool absolut 10 cc. Soluția II: soluție apoasă concentrată de carbonat de litiu 1 cc, apă distilată 90 cc. Soluția I se amestecă cu soluția II în părți egale cu câteva zile înainte de întrebuințare pentru această colorație; 4) secțiunile colorate albastru-închise se spală timp scurt în apă distilată; 5) diferențiere în soluția: borax 2 g, fericianură de potasiu 2,5 g, apă distilată 100 cc, până ce eritrocitele rămân necolorate (sub control microscopic din când în când); 6) spălare în apă distilată; 7) montare în glicerină sau glicerină-gelatină.

Rezultat. Acizii graşi se colorează negru-închis. In acelaş fel se colorează însă şi granulațiile eozinofilelor, mastocitelor (Mastzellen) calciul şi fierul. Pentru diferențierea grăsimilor neutre se poate face o supracolorare cu Scharlach R.

§ 733. — Ca metode pentru *substanțele lipoide* se recomandă următoarele:

§ 734. — **Metoda lui Ciaccio**: 1) fixarea fragmentelor timp de 48 de ore în amestecul Ciaccio; 2) se trec fragmentele timp de 5—8 zile în soluția de bicromat de potasiu 3%; 3) spălare în apă curgătoare timp de 24 de ore; 4) deshidratare timp de 24 de ore prin alcooluri succesive şi alcool absolut (numai 1—2 ore), urmând includerea în parafină prin trecerea prin sulfură de carbon sau benzen (timp scurt!); 5) secțiunile la parafină deparafinate se trec din alcool de 70% în următoarea soluție timp de *30 de minute*: se face un amestec de: alcool 80%95 cc, acetonă 5 cc. Se încălzeşte amestecul de alcool-acetonă la 50°. Se pune Sudan III până la saturație. După răcire se filtrează. In acest amestec colorant se țin lamele deparafinate timp de 30—60 de minute la temperatura 30°; 6) alcool 50% câteva secunde; 7) spălare bună în apă distilată; 8) colorarea nucleilor cu hemalaun (even-

tual cu albastru de Nil); 9) montare în glicerină sau sirop Apathy (§ 509) sau Kasarinoff (§ 510).

Rezultat. Lipoizii nesaturați se colorează galben-oranj, restul lipoidelor (saturate) rămân necolorate. Nucleii violeți sau albaștri-violeți. Reacția nu este specifică pentru lipoizi, arată doar legăturile lor nesaturate.

§ 735. — **Metoda Lorrain-Smith-Dietrich** se face pe fragmente fixate în formol și secțiuni *la congelație*: 1) secțiunile la congelație se țin 1—2 zile în soluție 5% bicromat de potasiu la 37°; 2) spălare îndelungată în apă distilată schimbată; 3) colorare 4—6 ore la 37° cu hematoxilină acetică Culcițchi, care se prepară în felul următor: din soluția veche (de cel puțin 6 luni) de hematoxilină 10% în alcool absolut, se iau 10 cc și se amestecă cu 90 cc soluție 2% acid acetic; 4) spălare în apă distilată; 5) diferențiere la întuneric în lichidul lui Weigert (borax 2 g, fericianură de potasiu 2,5 g, apă distilată 100 cc); 6) spălare în apă; 7) montare în sirop Apathy sau levuloză (levuloza pentru montare se prepară în felul următor: levuloză 30 g se disolvă în apă distilată 20 cc). Amestecul se ține 24 de ore la 37°. Siropul trebue să fie dens și clar.

Rezultate. Lipoizii sunt colorați în albastru-negru (fosfatide cerebrozide). Tot în albastru-negru se colorează și pigmentul biliar, fierul și hemoglobina.

§ 736. — Ca metodă pentru colesterol se recomandă ca mai frecvent întrebuințate următoarele:

§ 737. — **Metoda Schultz**: se poate face pe piese fixate în formol (sau pe sediment din urină, spută, etc.).

1) Secțiunile la congelație (sau mai bine piese incluse în gelatină). Se ține 2—4 zile în termostat la 37° în soluția de 2,5% alaun de fier (violet); 2) spălare scurtă în apă distilată; 3) montarea pe lamă a secțiunii; 4) uscare suficientă cu hârtie de filtru; 5) se pun apoi câteva pictături dintr'o soluție de acid acetic și acid sulfuric concentrat, în părți egale; 6) se pune o lamelă și se examinează imediat.

Rezultate. Grăsimile care conțin colesterol se colorează în verde-albastru, iar câteva ore se decolorează.

§ 738. — **Metoda Golodeț.** Pentru această metodă se prepară următoarea soluție: 2 părți formol 30%, 5 părți acid sulfuric. 1) Secțiunile la congelație din piese proaspete (nefixate) se culeg pe lamă; 2) pe lamelă se pun câteva picături din soluția de mai sus și se așează pe secțiune. Se examinează la microscop; 3) după 1—2 minute, țesuturile care conțin colesterol se colorează în roșu-cafeniu.

GLICOGENUL

§ 739. — Metodele pentru glicogen necesită uneori condiții speciale de fixare și includere.

§ 740. — **Fixatori și includere:** Glicogenul se disolvă și difuzează în fixatorii obișnuiți. Fragmentele trebue luate cât mai curând după deces.

1) Alcoolul absolut este destul de bun, însă are defectul că pătrunde neuniform în piese și întărește. In lipsă de alt fixator poate fi utilizat, cu condiția însă ca să se ia piese cât mai subțiri posibil; 2) fixare în amestecul Susa; 3) soluția saturată de dextroză în formol concentrat; 4) formol 1:4 saturat în dextroză.

§ 741. — **Fixarea după Neukirch.** 1) fragmentele se țin 6—12 ore în soluție saturată de dextroză în formol 35%; 2) trecerea fragmentelor în soluție saturată de dextroză în alcool 80% timp de 6 ore; 3) alcool 96° schimbat de mai multe ori timp de 24 de ore; 4) includere la celoidină; 5) colorația carmin Best.

§ 742. — **Amestecul Pasteels și Leonard.** 8,5 părți soluție saturată de acid picric în dioxan 1 parte formol, 0,5 părți acid acetic. Fixare timp de 1 oră, includere la parafină prin dioxan.

§ 743. — **Amestecul Gendre.** 8 părți soluție saturată de acid picric în alcool 90%; 1,5 părți formol; 0,5 părți acid acetic. Fixare timp de 1—4 ore; spălare în alcool 90%; includere în parafină. Prin fixare în alcool se poate utiliza includerea la celoidină.

§ 744. — **Amestecul Șabadaș** are proprietatea de a distruge sistemele glicolitice, precipită bine glicogenul și pătrunde repede. Acest amestec este format din: alcool de 96% 53 g, picrat de calciu 35 g, acid monocloracetic 5 g, formol 4% 5 g.

§ 745. — Se mai poate folosi metoda de includere a lui *Pfuhl*: deshidratare în alcool, eter-alcool, celoidină 2%, celoidină 4% câteva zile, cloroform până la clarificare, benzen-fenolat 1:10 timp scurt, benzen 2 băi, benzen-parafină, parafină.

§ 746. — Ca metode de colorare pentru glicogen dăm ca fiind mai importante următoarele:

§ 747. — **Metoda Langhans**: piesele sunt fixate în alcool absolut sau amestecuri de acid picric în alcool. Includere la parafină. 1) secțiunile deparafinate se pun în soluția Lugol (iod cristalizat 1 g, iodură de potasiu 2 g, apă distilată 100 cc) timp de 5—10 minute; 2) spălare în alcool absolut saturat cu iod sau 4 părți alcool absolut, 1 parte tinctură de iod; 3) montare în ulei de origan; 4) în jurul lamelei se pune parafină. Se poate face o supracolorare cu carmin alcoolic sau hematoxilină Delafield.

Rezultate. Glicogenul este colorat în cafeniu. Preparatele se pot menține câteva luni.

§ 748. — **Metoda Best.** Prepararea colorantului: 2 g carmin rubr. opt., 1 g carbonat de potasiu, 5 g clorură de potasiu, 60 cc apă distilată. Se pune într'o capsulă de porțelan și se încălzește încet la flacără timp de câteva minute, însă cu grijă, să nu ajungă la fierbere. După răcire se adaugă 20 cc amoniac concentrat. Soluția aceasta, numită «soluție-

mamă », se poate folosi imediat. Se scrie data preparării pe etichetă (deoarece nu durează mult, vara o lună, iarna două luni), se pune într'o sticlă brună bine astupată. Inainte de colorare se filtrează. *Colorare*. 1) Secțiunile deparafinate (sau la celoidină) se colorează intens cu hematoxilină sau hemalaun. Eventual diferențiere în acid clorhidric; 2) spălare în apă; 3) colorare 5—20 de minute în soluție carmin Best diluată (proaspătă!), 20 cc din soluția carmin Best mamă (filtrată), 30 cc amoniac concentrat, 30 cc alcool metilic; 4) se trece direct pentru diferențiere în soluția (în mai multe cristalizoare seriate): 40 cc alcool metilic, 80 cc alcool absolut, 100 cc apă distilată, 1—5 minute, până nu mai iese colorat; 5) spălare în alcool 80%; 6) deshidratare în alcool 95°—alcool absolut; 7) xilen-balsam de Canada.

Rezultate. Glicogenul se colorează în roșu-intens, nucleii albaștri. Colorația nu este electivă. Tot în roșu se colorează fibrina, mucusul, corpii amilacei, granulele mastoicitelor și epiteliile stomacului.

§ 749. — Metode combinate pentru glicogen și grăsimi. Menționăm ca fiind mai importante următoarele:

§ 750. — Metoda Arndt: 1) fixare în formol-dextroză 24 de ore (dextroză saturată în formol 1:4); secțiuni la congelație. Secțiunile se culeg în apă saturată cu dextroză sau în alcool 70%; 3) colorare cu carmin Best 45—60 de minute; 4) diferențiere în soluția alcool-amoniacală Best; 5) colorarea nucleilor în soluția de hemalaun sau hematoxilină saturată cu dextroză; 6) spălare în soluția apoasă saturată cu dextroză; 7) alcool 70% 1 minut; 8) colorare în soluția alcool-clorofilă (vezi § 731) 3—20 minute; 9) trecere scurtă în alcool 70%; 10) spălare în soluție apoasă saturată dextroză 1 minut; 11) includere în sirop de levuloză (30 g levuloză, 20 cc apă distilată, se ține 24 de ore la termostat la 37°).

Rezultate. Nucleii sunt albaștri, grăsimile verzi, glicogenul roșu.

§ 751. — O altă metodă cu rezultate frumoase este următoarea: 1) fixarea fragmentelor timp de 8—12 ore în una din următoarele soluții: 20 cc soluție concentrată de sublimat în apă, 20 cc soluție acid osmic 2%, 10 cc acid acetic, 50 cc alcool absolut; sau 1,5 cc soluție apoasă de acid cromic 10%, 4 cc soluție apoasă de acid osmic 2%, 1 cc acid acetic, 13,5 alcool 75%; 2) spălare în mai multe alcooluri absolute timp de 24 de ore; 3) includere la parafină; colorația Best.

Rezultate. Glicogenul se colorează în roșu, iar grăsimile neutre în negru.

§ 752. — Colorația glicogenului după Bauer-Feulgen. 1) Fixare de piese subțiri 24 de ore în amestecul de 9 părți alcool saturat cu acid picric, 1 parte formol neutru concentrat. Unii autori recomandă fixarea în acest amestec la răcitor; 2) spălare cu alcool absolut și includere la parafină; 3) secțiunile deparafinate se trec în apă distilată și apoi 4) într'o soluție de acid cromic 4% — 1 oră și la întuneric,

	Acid clorhidric „ sulfuric „ azotic „ acetic	Hidrați de sodiu și potasiu, amoniac	Alcool Cloroform Eter Benzen	Apă oxigenată	Reacția pentru fier	Reacția pentru grăsimi cu Sudan, Scharlach, etc.	Reacții speciale microchimice
Hemosiderina	solubilă	insolubilă	insolubilă	rămâne neschimbată	pozitivă	negativă	Reacția pozitivă pentru fier
Hematoidină (Bilirubina)	reacția dă o colorare caracteristică	se disociază și se fragmentează	greu solubilă	rămâne neschimbată	negativă	negativă	Reacția Gmelin
Pigmentul malaric	solubil la cald în acizi alcoolici	solubil	insolubil	se decolorează	negativă	negativă	Nu există
Melanina	insolubilă	solubilă în soluții concentrate	insolubilă	se decolorează	negativă	negativă	Afinitate față de săruri de argint
Cromolipoidul (Lipofuscina)	insolubil	în general insolubil; uneori se disociază	parțial solubil	se decolorează dacă e ținut mult	negativă	parțial pozitivă	Se colorează cu Nilblau și roșu neutru
Carotinoidul (Lipocromul)	insolubil în acizi slabi, cu ioare albastră cu acid sulfuric concentrat	insolubil în soluții slabe	parțial solubil	se decolorează rapid	negativă	pozitivă când e inclus în grăsimi	Reacția violetă-închis cu Lugol

sau în soluție acid cromic 1% — 12 ore și la întuneric; 5) spălare în apă curgătoare 5 minute; 6) din apă se trec lamele în reactivul Schiff, unde se țin 10—15′; 7) spălarea lamelor câte un minut și jumătate în trei băi cu bisulfit de sodiu (soluție proaspătă) care se prepară astfel: 200 cc apă de robinet, 10 cc acid clorhidric normal (vezi pct. 6), 10 cc soluție 10% bisulfit de sodiu; 8) spălare în apă de izvor (curgătoare) 10 minute; 9) colorarea nucleilor cu hemalaun sau hematoxilină acidă; 10) spălare, deshidratare prin alcooluri. Xilen, montare în balsam de Canada.

Rezultate. Glicogenul se colorează în roșu-violet; nucleii în albastru. Se colorează deasemanea în roșu mucusul din glandele salivare și tractul digestiv; coloidul tiroidei și fibrinoidul din placentă.

§ 753. — **Prepararea reactivului Schiff** se face în felul următor: se disolvă la cald (în flacon Erlenmeyer) în 100 cc apă distilată 1 g fuxină bazică pulverizată. Soluția se filtrează călduță într'un flacon brun cu dop șlefuit. După răcire (aproximativ o oră) se adaugă: 20 cc acid clorhidric normal și 1 g bisulfit de sodiu ($NaHSO_3$) pro analisi. *Soluția de acid clorhidric* normal se prepară astfel: în 100 cc apă distilată se pun 8,3 cc acid clorhidric concentrat cu densitatea specifică 1,19. Soluția se ține apoi 24 de ore la temperatura camerei, la întuneric, în care timp se face decolorarea ei, până începe să devină gălbuie. Dacă e roză nu este bună și se face o nouă soluție. Reactivul Schiff se păstrează în flacon brun cu dop șlefuit.

PIGMENȚII

§ 754. — **Pigmenții endogeni.** Cele mai bune rezultate se obțin pe fragmente proaspete (biopsii și material de autopsie recoltat curând după moarte).

§ 755. — **Fixarea** în formol *neutru* (sau în alcool absolut pentru hemosiderină, pigment malaric și melanină). Trebue evitați complect fixatorii acizi și fixatorii cu săruri metalice grele.

Solubilitatea și reacțiile histochimice ale pigmenților sunt variabile în diverse substanțe. După aceste caractere se pot uneori diferenția și fără colorații speciale.

Hueck a întocmit un tabel comparativ, din care extragem câteva caractere diferențiale ale pigmenților.

§ 756. — **Pigmenții hematogeni. Hemosiderina** dă reacția pozitivă pentru fier, pe când hemoglobina rămâne negativă.

§ 757. — **Reacția cu albastru Turnbull.** 1) Secțiuni la congelație parafină sau celoidină; 2) din apă distilată se trec secțiunile în soluție concentrată de sulfat de amoniu (de culoare galbenă!) timp de 1—24 de ore (de obicei se țin 1—2 ore); 3) spălare atentă în apă distilată; 4) se trec secțiunile timp de 15 minute într'o soluție proaspătă, formată din părți egale de: fericianură de potasiu 20% și acid clorhidric 1%;

5) spălare abundentă în apă distilată; 6) colorare nucleară cu alaun-carmin sau paracarmin; 7) spălare în apă distilată; 8) deshidratare prin alcooluri, xilen, balsam.

Rezultate. Pigmenții care conțin fier se colorează în albastru, iar nucleii în roșu.

§ 758. — **Reacția Perls** (*albastru de Berlin*). 1) Secțiunile din apă distilată se trec timp de 30—60 de minute într'un amestec proaspăt compus din: soluție acid clorhidric 1%—25 cc, soluție ferocianură de potasiu 2% 8—10 picături (soluție proaspătă!); 2) spălare atentă în apă distilată; 3) colorarea nucleilor cu alaun-carmin sau paracarmin; 4) spălare, deshidratare prin alcool, xilen, balsam.

Rezultate. Pigmenții cu compuși din oxid de fier se colorează în albastru, iar nucleii în roșu.

§ 759. — **Hematoidina** (*bilirubina*). Pentru punerea ei în evidență se întrebuințează *reacția Gmelin*: 1) secțiunile la congelație din piese proaspete sau fixate în formol neutru se montează în apă distilată pe lamă; 2) pe lamelă se pune o picătură de acid sulfuric concentrat și se așează pe secțiune. Se poate așeza întâi lamela și se pune acidul sulfuric în jurul lamelei cu o pipetă fină.

Rezultate. In prezența bilirubinei se formează imediat inele concentrice colorate dela roșu-purpuriu la violet și până la albastru-verde.

§ 760. — **Pigmentul malaric** (*hemozoina*). Pentru acest pigment nu există reacții speciale ca să-l putem pune în evidență. De obicei se face diferențierea între melanină și hemozoină prin solubilitatea în diverse substanțe (vezi tabelul Hueck). Pigmentul malaric poate să dea reacția pozitivă pentru fier dacă secțiunile sunt ținute 12 ore în soluție 1% de acid clorhidric sau soluție 2% acid oxalic, apoi trecute prin soluție 1% de hidrat de potasiu și făcută apoi reacția pentru fier (Turnbull-blau sau Perls).

§ 761. — **Pigmenți autogeni**: vom da aici metodele pentru melanină, lipofuscină, carotinoid.

§ 762. — **Melanina** este insolubilă în acizii clorhidric, sulfuric, azotic și acetic. Este solubilă soluția concentrată de hidrat de sodiu și potasiu. Este insolubilă în alcool, eter, cloroform, benzen. Se decolorează în apă oxigenată și amestec de crom. Este negativă la reacția pentru fier. Este negativă la coloranții pentru grăsimi și lipide. Are afinitate pentru sărurile de argint. Se înnegrește secundar cu acid osmic.

Tehnică. 1) Secțiunile se pun în soluție 3% de apă oxigenată timp de 1—3 zile, în care timp pigmentul se decolorează; 2) decolorarea se poate face și în diafanol. Secțiunile se trec din alcool de 65% în diafanol 12—24 de ore. Se spală în apă și se trec în apă; 3) pentru punerea în evidență a melanoblaștilor se poate face reacția *dopaoxidază* (după Bloch).

§ 763. — **Lipofuscina** (*cromolipoidul*), insolubilă în acizi și hidrații de sodiu și potasiu, uneori se fragmentează.

Parțial solubilă în alcool, eter, cloroform și benzen. Se decolorează în apă oxigenată dacă e ținută mult timp. Reacția pentru fier negativă. Parțial pozitivă la Sudan, etc. Se decolorează cu albastru de Nil și roșu neutru.

§ 763 a. — **Metoda Volkmann.** Fragmente fixate în formol neutru. Secțiuni la congelație sau parafină. 1) Colorație timp de 5—15 minute cu violet de gențiana (la 100 cc apă anilinată se pun 11 cc de soluție saturată alcoolică de violet de gențiana proaspăt preparată!!); 2) spălare în apă; 3) diferențiere în alcool 80 % până se colorează fondul preparatului (timp variabil dela 15 minute — 2 h); 4) alcool 96° absolut, xilen, balsam.

Rezultate. Cromolipoidul se colorează în violet-închis.

§ 764. — **Metoda Romeis.** Fixare în formol-alcool (1 parte formol + 2 părți alcool 80%). Includere la parafină. 1) Colorare în albastru de metilen policrom 10 minute; colorant preparat în comerț sau făcut în laborator (albastru de metilen 1 g, apă distilată 100 cc, alcool 96° 20 cc). Se adaugă 1 g de carbonat de potasiu; 2) se spală cu apă distilată; 3) diferențiere în amestecul eter glicerină Unna (diluat cu 4—10 părți de apă distilată) timp de 1/2—1 minut (nu mai mult!) până se decolorează în albastru-palid (se recomandă amestecul comercial); 4) spălare abundentă în apă distilată 2—5 min.; 5) uscare cu hârtie de filtru; 6) trecere rapidă prin alcool absolut și xilen, balsam.

Rezultate. Lipofuscina se colorează în albastru.

§ 765. — **Carotinoidul** *(lipocromul)* se găsește în celulele luteinice și în xantoame. Uneori este amestecat în grăsimi. Este insolubil în acizi slabi. Dă reacție albastră în acid sulfuric concentrat. Insolubil în soluții slabe de hidrați. Puțin solubil în alcool, cloroform. Se decolorează în apă oxigenată. Reacția negativă la fier. Reacție pozitivă la Sudan și Ciaccio când e inclus în grăsimi. Reacție negativă la albastru de Nil și roșu neutru.

§ 766. — **Microreacția.** Secțiunile se tratează cu lugol. Lipocromul ia o culoare violetă-închis.

FERMENȚII ȘI VITAMINELE

§ 767. — Următoarea definiție a fermenților este destul de cuprinzătoare: sunt substanțe cu acțiune catalitică, produse de celulele vii, fără ca acțiunea lor să fie strict legată cu procesele vitale. Sunt capabile să favorizeze procese chimice, rămânând totuși neschimbate prin acest proces, lucrând în mod specific, adică nelucrând decât asupra substanțelor cu constitutii structurale și stereochimice cu totul definite.

Fermenții sunt termolabili, distruși în mod ireversibil la o anumită temperatură, activitatea lor desfășurându-se în condiții precise ale mediului în ceeace privește temperatura, concentrația salină, pH-ul mediului. Pot fi distruși de anumite substanțe chimice.

Capitolul cercetărilor fermenților în histochimie cuprinde expunerea diverselor metode practice propuse pentru a evidenția, pe secțiuni sau frotiuri, prezența fermenților.

Biochimic, toți fermenții cercetați în histochimie sunt oxidanți sau reductori. Ei sunt însă subîmpărțiți după condițiile lor de activitate în: fenolaze, perioxidaze, tiroxinaze, dopaoxidaze, oxidoreductaze.

Există însă nepotriviri de terminologie între unele denumiri întrebuințate de histochimie și termenii precisi ai biochimiei. De aci rezultă o serie de complicații în nomenclatura tehnicilor și în înțelegerea fenomenelor.

De exemplu, sub denumirea de oxidaze, biochimiștii cuprind toți fermenții capabili să catalizeze o reacție de oxidare. Are astfel un cuprins foarte larg, aci intrând: fenolazele, purinoxidazele, succinoxidazele, tiroxinazele, alcoolazele, etc. Histochimiștii utilizează însă termenul de oxidaze într'un sens mai strâmt, cuprinzând numai fenolazele. Deci, cercetarea oxidazelor, în sens histochimic, nu este decât cercetarea unui grup din oxidazele biochimiștilor, și anume, a fenolazelor.

§ 768. — Metodele de cercetare a fenolazelor se bazează pe sinteza indofenolului și se practică prin utilizarea a două soluții echimoleculare, de naftol și de dimetilparafenilendiamină; deaceea, această reacție se numește prescurtat reacția *Nadi.*

Vor fi date tehnici separate pentru fermenții oxidazici stabili (reacția m. nadioxidazică) și pentru fermenții oxidazici labili (reacția γ-nadioxidazică), fiind necesare modalități de comportare deosebite.

§ 769. — **Reacția mielonadioxidazică** (pentru fermenți oxidazici stabili).

Se poate executa pe secțiuni la ghiață, materialul fiind fixat în formol 40%. Colorarea se face cât mai curând. Frotiurile de sânge sau pelicule de organe se pot fixa în vapori de formol sau alcool 96° cu 20% formol. Se întrebuințează soluțiile alcaline de naftol și dimetilparafenilendiamină.

Prepararea reactivilor. 1) *Soluția de α naftol.* Se fierb 100 cc apă distilată cu 1 g naftol și se adaugă, cu picătura, din soluția 25% de KOH, până la dizolvare. Se răcește. Soluția se conservă 1 lună. 2) Soluția de dimetilparafenilendiamină. Se disolvă 1 g din această substanță, ce se găsește în tuburi închise a 1 g, în 100 cc apă distilată fiartă. Soluția se păstrează la întuneric 2—3 săptămâni. Substanța aflată în comerț în borcane deschise se înnegrește cu timpul și nu mai este utilizabilă. Inainte de întrebuințare se amestecă părți egale din cele două soluții. Amestecul este foarte oxidabil, deaceea s'a propus diluarea acestor soluții la 1‰.

Colorare. 1) Secțiunile sau frotiurile sunt acoperite cu amestecul celor doi reactivi, în momentul întrebuințării. Operația se face într'un vas de colorat, la aer, pentru a permite oxigenarea. Reacția se produce

în 1—5 minute. 2) Stabilizarea colorării se face prin trecerea în soluția lugol 1/3, timp de 2—3 minute (Gröff). Granulele devin brune. 3) Spălarea secțiunilor în apă, alcalinizată prin câteva picături din soluția saturată de carbonat de litiu, până ce granulele redevin albastre. 4) Colorarea fondului cu safranină, carmalaum, brun Bismarck. 5) Montare în glicerină, glicerină-gelatină, sirop Apathy.

Rezultate. Granulele oxidazice sunt colorate în albastru. Le găsim mai cu deosebire în elementele sanguine din seria mielogenă. Deaceea reacția se numește și *mielonadioxidazică*. Se mai găsesc în celulele seroase din glandele salivare și lacrimale, deasemenea în sincițioblaștii placentei.

Preparatele se păstrează puțin timp.

§ 770. — Reacția pentru evidențierea fermenților oxidazici labili (*reacția γ-nadioxidazică*).

In țesuturile nefixate tratate cu un amestec « Nadi » nealcalin apare coloratia albastră a reacției în unele celule, colorație care nu apare după tehnica obișnuită cu reactivi alcalini. S'a dovedit că pH-ul amestecului « Nadi » are importanța cea mai mare în reușita operației, deaceea s'a recomandat utilizarea de soluții tampon.

Oxidazele labile sunt foarte sensibile la diversele acțiuni externe, deaceea reacția nu se produce pe material fixat. Piesele trebue ținute la ghiață sau secționate imediat după recoltare.

Prepararea reactivilor. 1) Soluție de α- naftol α: se face din o soluție alcoolică 10 %. In momentul întrebuințării se prepară soluția necesară amestecului diluând cu apă distilată până la 1 %; 2) soluție 1,2 ‰ de dimetilparafenilendiamină, care se păstrează în flacoane bine închise, cu dop parafinat, la întuneric; 3) soluții tampon, cuprinzând o zonă a pH-ului între 3 și 12, făcute cu baloane jojate, nu în eprubete gradate, după datele din cărțile de specialitate.

Rezultatele bune pentru piese dela animale se obțin cu soluții având un pH cuprins între 7,8—8,2, iar pentru piesele vegetale cu un pH 3,4—3,9.

Colorare. 1) Secțiunile din piesele nefixate sunt puse în amestecul de părți egale din soluția de α- naftol, diluată, și soluție de dimetil-parafenilendiamină, la care se adaugă din soluțiile tampon, până la obținerea pH-ului dorit. După câteva minute, secțiunile sau frotiurile se colorează în albastru; 2) Secțiunile se trec pe lamă și se usucă cu hârtie de filtru, sau se spală cu o soluție clorurată izotonică, și 3) se face colorarea nucleilor cu carmin litinat. Se examinează la microscop, între lamă și lamelă, într'o soluție de acetat de potasiu. Preparatele nu se pot păstra.

Rezultate. Oxidazele labile apar sub formă de granule colorate în albastru-închis, sau sub forma unui precipitat de materie colorantă în interiorul citoplasmei multor celule, nucleul rămânând incolor (Lison). Domeniul acestei reacții, atunci când este bine executată, este foarte întinsă, în contrast cu al reacției mielonadioxidazice care este foarte restrâns. In schimb, aceste oxidaze (γ-nadioxidaze) sunt foarte sensibile, se evidențiază numai pe piese foarte proaspete.

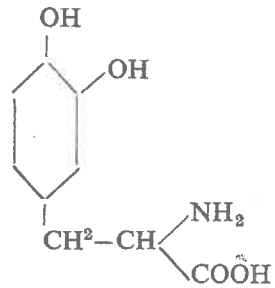
Grăsimile aflate în citoplasmă se colorează în acelaș timp în violet, prin solubilitatea albastrului de indofenol în ele.

§ 771. — Dopaoxidazele sunt fermenți ce se găsesc în unele celule din epiderm, foliculul pilos sau din unele tumori epiteliale și care sunt capabili să oxideze dioxifenilalanina (dopa), cromogen premelanic normal la mamifere, și pe care îl transformă în melanină. Punând în contact secțiuni de piele proaspătă cu soluții de «dopa» se formează un pigment negru, dopamelanina, în caz că există dopaoxidaze.

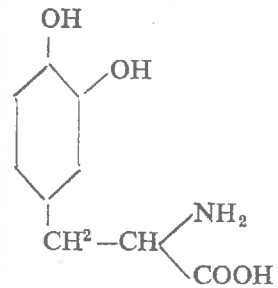
Tehnică. 1) Se pun într'o soluție caldă de agar fragmente mici de piele proaspătă. Se lasă să se răcească agarul și apoi blocul gelatinos se taie la microtomul cu ghiață; 2) secțiunile cât mai subțiri, se pun într'o soluție de 0,1—0,2% de dioxifenilalanină (dopa), într'un vas colorat, cu dop bine închis, la termostat la 37°. Se lasă 24 de ore, la întuneric. Soluția de « dopa » trebue să fie clară. Dacă este închisă la culoare, se înlocuește; 3) secțiunile se spală apoi cu apă distilată; 4) se pot face colorări de contrast cu verde de metilpironină; 5) montare în glicerină sau în balsam. Pentru a se obține rezultate favorabile trebue să se lucreze cu vase cât mai curate, ca și pentru o impregnare.

Rezultate. Dacă există fermentul « dopa » oxidazic se produc granule negre de dopamelanină.

§ 772. — Tirozinaza este un ferment care lucrează asupra tirozinei, dând prin oxidare melanină. Tirozina este foarte apropiată chimicește de « dopa », nediferând decât printr'un grup OH în minus.



dopa



tirozina

Dopa este mai labilă și mai ușor atacabilă, chiar de o tirozinază puțin activă, incapabilă să acționeze asupra tirozinei. Astfel, tirozinaza are un rol în melanogeneză. Acest ferment este deosebit de oxidaze, fenolaze și peroxidaze, care nu sunt active asupra tirozinei, însă tirozinaza acționează asupra reactivilor de evidențiere ai fenolazelor și peroxidazelor.

S'a cercetat tirozinaza pe aripile fluturilor în desvoltare, înainte de pigmentare. Punând în contact aceste piese cu soluția de tirozină apar desenele ce există pe aripile fluturelui complect desvoltat.

Tehnică. Ţesuturi proaspete, nefixate, se pun într'o soluţie rece, saturată, de tirozină, timp de 1—24 de ore.

Rezultate. Pe locul unde există tirozinază apar granule de culoare violetă-închis, spre negru.

§ 773. — **Peroxidazele** sunt fermenţi care cresc puterea oxidantă a peroxizilor, sau catalizează descompunerea lor, oxigenul produs servind la oxidarea unei substanţe acceptoare, oxidabilă.

Chimia organică ne indică multe substanţe care pot fi utilizate ca acceptori. Din punct de vedere chimic avem de a face, de cele mai multe ori, cu oxidări şi condensări ale nucleilor aromatici. Din seria mare a acceptorilor, în histologie nu se utilizează decât puţine substanţe. La început a servit gaiacolul, iar acum se utilizează benzidina, naftolul, leucozincurile, substanţe care în contact cu cuplul peroxidază-peroxid dau reacţii colorate, utilizabile.

Peroxidazele sunt fermenţi rezistenţi la acţiunea formolului, alcoolului, toluenului şi chiar şi la o scurtă fierbere. Sunt mai puţin sensibili la variaţiile de pH ale mediului (între 2 şi 12) şi deasemenea concentraţia în perhidrol poate varia destul de larg.

§ 774. — **Metoda Prenant.** Se pot utiliza piese proaspete, nefixate. 1) Se trec piesele în soluţia saturată de benzidină, acidificată cu câteva picături de acid acetic; 2) se trec apoi în soluţie 1% perhidrol, sau în apă oxigenată din comerţ (de 12 volume), diluată 1/12, timp de câteva minute; 3) trecerea în apă distilată sau o soluţie clorurată izotonică, în care se şi examinează, între lamă şi lamelă. Pentru a menţine culoarea albastră, preparatul se va examina în apă sau în sirop Apathy.

Rezultate. Benzidina este oxidată într'un corp de culoare albastră-închis (albastru de benzidină), format din asociaţia unei molecule de benzidină cu o moleculă de difenonchinodiimină. Acesta fiind instabil, se oxidează repede şi dă un corp de culoare brună, difenochinondiimină, fără molecula de benzidină.

§ 775. — **Metoda Loele** se utilizează pentru frotiuri sau secţiuni. *Soluţia de benzidină.* Se disolvă prin agitare 1 g benzidină în 200 cc apă distilată. Se filtrează. La 50 cc din filtrat se adaugă 1 cc de perhidrol 1%. Soluţia se acidifică uşor cu acid acetic.

Tehnica reacţiei: 1) Frotiurile sau secţiunile la ghiaţă, din piese fixate în formol, se pun în soluţie de benzidină, timp de 3—5 minute; 2) se face colorarea nucleilor cu carmin, sau soluţie apoasă de albastru de metilen; 3) se poate face examinarea în apă, sau sirop Apathy, sau se face trecerea prin seria de alcooluri urmate de clarificare; xilen, montare balsam.

Rezultate. Preparatele, nemontate în balsam, prezintă granulele peroxidazice colorate în albastru. Pe preparatele montate în balsam, unele granule sunt albastre, altele trec în brun. Eritrocitele trebue să rămână necolorate.

§ 776. — **Tehnica cu benzidină-safranină**, pentru frotiuri de sânge (tehnica Roschin, 1951). 1) Frotiul de sânge se usucă în aer; 2) se toarnă peste el o soluţie 0,5 % sulfat de cupru şi se ţine timp de 1 minut, apoi se scurge reactivul; 3) se tratează timp de 2 minute cu reactivul benzidină peroxidază; se freacă în mojar 0,25 g benzidină cu câteva picături apă distilată; apoi se adaugă 200 cc apă distilată şi se filtrează. La filtrat se adaugă 4 picături de perhidrol 3%; 4) se spală cu apă de robinet; 5) se colorează timp de 1 minut în soluţie 1% safranină, în apă distilată; 6) se spală cu apă. Se usucă.

Rezultate. Peroxidazele din leucocitele granulare se colorează în albastru, iar nucleii apar în roşu-portocaliu.

§ 777. — **Tehnica cu benzidină-nitroprusiat-fuxină bazică** se utilizează tot pentru frotiuri.

Tehnica. 1) frotiul de sânge, bine uscat, se acoperă cu reactivul colorant, timp de 1 minut (se disolvă 0,05 g nitroprusiat de sodiu în 2 cc apă distilată. Se adaugă 100 cc alcool 95°; 0,05 g benzidină; 0,05 g fuxină bazică şi 0,50 cc perhidrol); 2) se adaugă peste reactiv aceeaşi cantitate de apă distilată, cu perhidrol, în cantităţi egale, şi se ţine 3—4 minute; 3) se spală cu apă. Se usucă.

Rezultate. In leucocitele granulare apar multe granule albastre, iar în monocite puţine. Nucleii se colorează în albastru (tehnica Roschin, 1951).

§ 778. — **Naftol-reacţia pentru oxidaze.** Se bazează pe următorul principiu: unele granulaţii celulare iau în contact cu soluţia alcalină de α-naftol o culoare violetă, care nu se păstrează. Insă, dacă se tratează simultan sau succesiv cu un colorant bazic, atunci substanţa născută prin acţiunea α-naftolului se colorează intens cu colorantul bazic, păstrând această culoare şi după acţiunea alcoolului şi xilenului, deci după montarea în balsam.

Prepararea reactivului. Intr'o eprubetă se pune un vârf de cuţit din α-naftol şi se adaugă din soluţia 10% KOH, până ce naftolul se disolvă. Apoi se diluează cu 200 cc apă distilată. Se lasă 24 de ore, până ce soluţia ia o culoare gălbuie. Soluţia se conservă 3 săptămâni.

Tehnica. 1) piese fixate în formol; 2) secţiuni la ghiaţă; 3) tratare cu reactiv, timp de câteva minute; 4) spălare în apă; 5) montare în glicerină.

Rezultate. Substanţele acceleratoare ale oxidaţiilor sunt colorate în violet, cu nuanţe variate, până la negru. Preparatele nu se păstrează.

După punctul 4 se poate colora rapid în soluţie saturată apoasă de violet de genţiană; diferenţiere în soluţie lugol; deshidratare alcool, clarificare xilen. Montare în balsam.

Rezultate. Granulaţiile, din mielocite, granulocite sau alte celule sunt colorate în violet. Preparatele se păstrează timp îndelungat.

§ 779. — **Reacţia naftolperoxidazică.** In această reacţie se utilizează ca acceptor α-naftolul. Oxidarea sa de către cuplul peroxid-peroxidază

dă naştere la o substanţă colorată în violet, care nu-şi păstrează însă culoarea. Această substanţă posedă însă o deosebită bazofilie, astfel că dacă este tratată cu alţi coloranţi bazici, ca violet de genţiană sau albastru de toluidină, rezistă la acţiunea alcoolului, putând astfel să montăm preparatele. Punem astfel indirect în evidenţă peroxidazele, pe secţiuni.

§ 780. — Metoda cu soluţia de α-naftol. Preparatele obţinute nu sunt durabile.

Reactivul: la un litru de soluţie clorurată izotonică se pune o linguriţă de α-naftol. Se agită bine şi se lasă în repaus trei zile. Apoi se filtrează. Soluţia se conservă o lună. La întrebuinţare se adaugă la 50 cc soluţie filtrată 1 cc soluţie 1% perhidrol.

Tehnica. 1) piesele sunt fixate în soluţie 10 % formol, neutru; 2) secţiuni la ghiaţă; 3) trecere scurtă, de câteva minute, în reactiv; 4) spălare cu apă; 5) montare în glicerină.

Rezultate. Naftolperoxidazele sunt colorate în violet-închis. Preparatele nu se păstrează. Uneori oxidazele, în reacţie cu α-naftol, apar mai repede şi mai intens decât peroxidazele; alteori oxidazele sunt negative, iar peroxidazele sunt pozitive.

§ 781. — Evidenţierea naftolperoxidazelor cu violet de genţiană. Pentru a face din secţiuni preparate care să aibă o durată lungă se tratează piesele cu o soluţie de naftol-violet de genţiană.

Reactivul colorant. Intr'o soluţie de α-naftol, prepatată ca în metoda precedentă (§ 780), se picură dintr'o soluţie saturată alcoolică de violet de genţiană, până ce se turbură soluţia. Se adaugă în această soluţie alcool 70° până ce redevine transparentă. Această soluţie colorantă, astfel preparată, se poate păstra mai mult timp.

Tehnica. Secţiunile după punctul 4, al metodei din (§ 780) sunt stropite timp de câteva minute cu reactivul colorant, care a fost preparat. 5) Diferenţiere în alcool 50°, până ce numai substanţele naftolpozitive apar colorate în violet; 6) montare în glicerină.

§ 781 a. — Frotiurile de sânge uscate se fixează cu alcool 80°; 2) se colorează cu reactivul colorant (soluţie naftol-violet de genţiană) până ce întregul frotiu se albăstreşte; 3) spălare în apă; 4) se stropeşte lama cu soluţia naftol-perhidrol, preparate ca în reacţia naftolperoxidazică (§ 780), lăsând câteva minute; 5) spălare cu alcool 50°. Uscare.

Rezultate. Trebue să fie colorate numai granulele peroxidazopozitive. Dacă eritrocitele s'au albăstrit, atunci este posibil ca granulele peroxidazice să nu mai fie evidenţiate.

§ 782. — Tehnica cu benzidină pentru secţiuni la parafină (Roschin, 1951). 1) Piesele mici au fost fixate în formol 10 %; 2) includere rapidă în parafină, după cum urmează: alcool 70° 1 oră; acetonă 30 minute; benzol 20 de minute; parafină 20 de minute; 3) secţiuni subţiri, se deparafinează cu benzen, timp de 20 de secunde, apoi acetonă 10 secunde; 4) secţiunile se tratează timp de 5 minute cu amestecul: benzidină

0,10 g, alcool 80° 25 cc, perhidrol 2 picături, care se diluează cu două părţi apă; 5) spălare apă, 5 minute; 6) colorare cu hematoxilină 2 minute; 7) spălare apă de fântână, 1 minut; 8) colorare cu o soluţie 0,1% eozină, timp de 20 de secunde; 9) deshidratare în alcool 95° timp de 30 de secunde; alcool absolut 5 secunde; clarificare în xilen. Montare balsam.

Rezultate. Granulele peroxidazice albastre, nucleii violeţi, citoplasma roză.

§ 783. — Metoda Epstein, cu albastru de toluidină, pentru frotiuri (tehnica Roschin, 1951). 1) Se fixează frotiul în alcool 90° 9 părţi, formol 1 parte; 2) spălare în apă distilată; 3) se trec timp de 3 minute în alcool 40° 100 cc, α-naftol 1 g, perhidrol 3% 0,2 cc; 4) spălare apă distilată timp de 15 minute, până la câteva ore; 5) colorare timp de 15 minute până la câteva ore în albastru toluidină 1 g, citrat de litiu 1 g, apă distilată 100 cc; 6) se clătesc repede în apă distilată; 7) trecere rapidă, 1 secundă, în soluţia 1% de tanin; 8) uscare hârtie de filtru.

Rezultate. Granulele cu peroxidaze se colorează în verde strălucitor.

§ 784. — Cercetarea proprietăţilor peroxidazice ale hemoglobinei. Mijlocul cel mai uşor de a detecta hemoglobina este bazat pe proprietăţile sale peroxidazice. Se utilizează ca acceptor benzidina. Metoda se aplică pe piese fixate sau pe piese proaspete.

§ 785. — Metoda Lison. 1) Se fixează piese foarte subţiri timp de 24 de ore; în formol neutru 10 cc, acetat de plumb 2,5 g, apă distilată 100 cc. Hemoglobina este transformată în hematină, care dă şi ea reacţia; 2) secţiuni la congelaţie (se poate face şi includere la parafină); 3) secţiunile sunt tratate timp de câteva minute cu acid azotic diluat, pentru a scoate precipitatele de plumb; 4) se trec secţiunile timp de 5 minute la 60°, în reactivul cu benzidină.

Se disolvă 0,10 g benzidină în 10 cc apă diluată fiartă; se complectează cu apă oxigenată q. s. 30 cc şi se încălzeşte la 60° (turburarea soluţiei nu aduce niciun impediment reacţiei); 5) spălare în apă distilată la 60°, apoi în apă rece; 6) colorarea fondului cu soluţie 2 % de verde de metil; 7) secţiunile la ghiaţă se montează în sirop Apathy. Secţiunile la parafină sunt uscate cu hârtie de filtru, apoi tratate cu α-isosafrol până la clarificare (circa 30 de minute). Toluen. Montare în ulei de cedru.

Rezultate. Hemoglobina apare în brun-închis; nucleii în verde.

§ 786. — Metoda Slonimschi-Lapinschi necesită: 1) fixarea pieselor în formol 15—20 cc, fericianură de potasiu 2,50 g, apă 100 cc. Prin fixare, hemoglobina din piese se transformă în methemoglobină. Durata fixării: 15—24 de ore; 2) spălare, timp de 24 de ore, în apă curgătoare; 3) includere de preferat în celoidină-parafină; 4) secţiunile deparafinate se tratează cu reactivul cu benzidină, preparat după cum urmează: se disolvă 0,10—0,20 g benzidină în 2—3 cc alcool 96°, se răstoarnă într'un vas care conţine 10 cc alcool 70° şi se adaugă 2 cc perhidrol 4% şi 1 cc soluţie benzidină, în acid acetic concentrat; 5) se spală cu alcool 76°;

6) colorare de contrast cu verde metil sau roşu neutru; 7) trecere rapidă prin seria de alcooluri, xilen şi montare în balsam.

Rezultate. Hemoglobina apare în brun.

§ 787. — Unii recomandă secţiunile la congelaţie, care dau rezultate mai sigure decât secţiunile la parafină. Deasemenea, colorarea pieselor întregi (membrana). Reacţia peroxidazică nu aparţine numai hemoglobinei, din seria pigmenţilor tetrapirolici. Deasemenea hematina, hemocromogenul, oxi- şi carboxihemoglobina dau reacţia peroxidazică.

Hematoporfirina, hematoidina şi hematosiderina nu dau această reacţie.

Peroxidazele hemoglobinei sunt foarte rezisente la căldură, temperatura de 180° nu le alterează, în timp ce peroxidazele ţesuturilor sunt distruse. In autoliza ţesuturilor apar deasemenea peroxidaze termostabile.

§ 788. — **Oxidoreductaze.** Hirsch, Buchmann, Roschin au arătat că în colorarea vitală a celulelor sau detaliilor celulare prin leucobazele albastrului de metilen intervine un ferment numit oxidoreductaza.

Roschin a arătat că, spre deosebire de normal, celulele tumorale nu se colorează cu leucoderivatul cu rongalit şi a propus să se utilizeze acest reactiv ca un mijloc de diagnostic al celulelor canceroase.

In cercetări făcute între 1932—1939, Roschin singur sau cu Laloviev (1935) a pus în evidenţă faptul că, prin leucobazele de albastru de metilen, citoplasma celulelor normale se colorează în albastru, iar nucleul în albastru-închis. Nucleii celulelor tumorale rămân incolore, iar plasma este deasemenea incoloră sau slab colorată în albastru. Cercetările au fost confirmate de Waltermann (1934) şi de Voinov (1940).

§ 789. — **Pregătirea leucobazelor de albastru de metilen.** După Roschin, se face în felul următor: la 10 cc din soluţia apoasă 0,1% de albastru de metilen se adaugă 800 mg tiosulfat de sodiu şi 3—5 picături din diluţia 1 : 2 de acid clorhidric (în apă distilată).

Soluţia de albastru de metilen trebue făcută cu apă distilată. Soluţia de albastru de metilen se va turna peste pulberea de tiosulfat uscat, adăugându-se acidul numai după disolvare. Se adaugă de preferat 4 picături de acid; se agită, se încălzeşte la 30°, până apare un precipitat cenuşiu. Se răceşte timp de 5 — 10′. Se filtrează prin hârtie dublă de filtru. Dacă filtrul are o culoare albastră se va ţine la întuneric câtva timp. Soluţia se păstrează 10—12 ore la întuneric. Leucobaza trebue să aibă o culoare galbenă sau să fie complect incoloră.

Tehnica. 1) Ţesuturi nefixate, normale sau patologice, se ţin la frig, la refrigerator, 1—2 zile. Se fac secţiuni la ghiaţă, groase de 10—15 microni. Se păstrează secţiunile într'un cristalizor cu soluţie clorurată izotonică; 2) se trec secţiunile pe lamă şi se întind bine. Se fac preparate comparative, normale şi patologice; 3) se colorează pe lamă cu soluţie de leucobază. Se prelungeşte coloraţia până ce ţesutul normal este intens colorat în albastru (în timp ce cel canceros rămâne necolorat); 4) se scurge leucobaza de pe lamă; 5) se spală cu o mare cantitate de apă distilată; 6) se trec lamele într'o soluţie apoasă 0,05% de fuxină acidă, timp de 2 — 3 minute, evitând supracolorarea; 7) se scurge coloranţul, se lasă să se usuce; 8) montare în glicerină, glicerină-gelatină sau balsam de Canada neutru.

Toată coloraţia se va face la întuneric şi se va avea grijă ca soluţia de leucobază să fie incoloră.

Rezultate. Ţesutul normal este albastru, în timp ce ţesutul tumoral este roşu.

§ 790. — **Succinhidraza** este un ferment răspândit în celulele vegetale şi în microorganisme şi care a fost studiat în laboratorul lui Roschin, punându-se la punct metoda histochimică de evidenţiere. Aceste studii au permis, deasemenea, consideraţii generale asupra fermenţilor.

Tehnica. 1) Se întrebuinţează material nefixat; 2) se fac secţiuni la ghiaţă; 3) se trec secţiunile în apă distilată; 4) se colorează secţiunile timp de 10—15 minute cu reactivul colorant: soluţia 0,05% albastru metilen 2 cc, soluţia 10% succinat acid de sodiu 2 cc, soluţie tampon fosfatic (Sorensen) pH 7,6 — 8 q.s. 10 cc; 5) se trece secţiunea pe lamă, în 1—2 picături de reactiv colorant, acoperind cu lamela şi evitând bulele de aer. Lipire.

Rezultate. Se cercetează la microscop rapiditatea cu care secţiunile devin incolore. Dacă se produce această decolorare putem afirma că în ţesuturile respective se găsesc succinhidraze.

Dacă ţesuturile sunt ţinute la termostat (60 — 80°) timp de 5 — 15 minute, se împiedică complect pozitivitatea reacţiei.

Soluţia 0,01% — 0,001% cianură de potasiu inactivează succinhidraza.

Deasemenea, pH-ul soluţiei influenţează asupra rapidităţii de decolorare a albastrului de metilen; pH optim 7,8. In unele ţesuturi reacţia se petrece omogen, în altele nu. De exemplu, în ficat găsim regiuni care se decolorează rapid, altele mai încet (tehnica Roschin, 1951).

§ 791. — **Fosfatazele.** Pentru a se cerceta aceşti fermenţi în ţesuturi se fixează fragmente mici în acetonă rece sau în alcool 80 - 85°. Fixarea trebue să fie cât mai rapidă; să nu depăşească 12 ore. Se poate face cercetarea şi pe piese dela necropsie. In piesele deshidratate, fermenţii rezistă la temperatura de 70° timp de 15 minute; o menţinere mai prelungită în alcool diluat distruge activitatea fermentului.

Includerea va fi cât mai scurtă, nu va dura peste 2 ore, la temperaturi ce nu vor depăşi 55 — 60°.

Secţiuni groase de 6 — 10 microni sunt lipite cu un strat subţire de celoidină pe lame, sau cu albumină-glicerină.

Principiu. Fosfatazele, lucrând asupra glicerofosfaţilor şi adenozintrifosfaţilor, desfac aceste substanţe, ionul de acid fosforic trecând într'o combinaţie insolubilă.

§ 792. — **Cercetarea fosfatazelor acide.** Fragmente subțiri care nu trec de 2 mm se fixează în acetonă rece, la răcitor (Roulet recomandă ca fixarea să dureze cel mult 24 de ore, la frigorifer, și apoi alte 24 de ore la temperatura laboratorului, schimbând de câteva ori lichidul fixator). Includere parafină care să nu dureze mai mult de 3 ore. Secțiuni de 6—8 microni. Secțiunile lipite pe lamă se deparafinează în mod obișnuit și se trec în apă distilată.

Soluțiile necesare: *a)* se face amestecul următor: soluția molară de acetat cu pH 4,7 — 5,3 (soluție tampon b) $2^1/_2$—$3^1/_2$ părți, soluție 5% azotat de plumb 1 parte, apă distilată 6 părți, soluție 2% glicerofosfat de sodiu 3 părți. Amestecul se poate păstra la răcitor câteva luni. La întrebuințare se diluează cu 2—3 părți apă distilată și se încălzește la 37°. *b)* Soluția tampon de acetat: se amestecă 100 cc dintr'o soluție molară de acetat de sodiu (13,6%) cu 100 cc din soluția molară de acid acetic (6%) pentru a obține pH = 4,7. Pentru a avea pH = 5 se iau 50 cc soluție acid acetic, iar pentru pH = 5,3 trebue 17 cc.

Tehnica. 1) Se trec secțiunile din apă distilată în soluția (*a*) și se țin în această baie timp de $^1/_2$—6 ore. Uneori, când sunt puține fosfataze, putem prelungi acțiunea amestecului până la 24 de ore. Roschin recomandă să stea la 37°; 2) se spală rapid în apă distilată; 3) trecere în soluție 2—3% acid acetic, pentru a îndepărta precipitatele (combinații ale plumbului cu albuminoidele); 4) o nouă spălare cu apă distilată; 5) trecere în soluția slabă de sulfit de sodiu sau amoniac timp de 1—2 minute (Roschin); 6) spălare prelungită în apă distilată; 7) colorare de contrast cu verde lumină; 8) deshidratare — clarificare — montare.

Rezultate. Precipitatul de fosfat de plumb apare sub formă de granule de culoare închisă.

§ 793. — Se pot face mai multe reacții complementare pentru a mări contrastul sau evidența precipitatului. De exemplu: *a)* Secțiunea se ține după timpul (4), timp de 1 minut, într'o soluție diluată de sulfit de amoniu, care face ca precipitatul să ia o culoare mai neagră. *b)* După timpul (4) se poate face o colorare, timp de 15 minute, cu amestecul: soluție 0,5% verde de metil 2 părți, soluție 0,5% roșu acridină 1 parte (soluții proaspete). Apoi spălare prelungită în apă. Uscare hârtie filtru, diferențiere în alcool 95°.

Rezultate. Precipitatul de fosfat apare în roșu, iar nucleii în verde-albastru.

§ 794. — **Fosfatazele alcaline.** Fixarea fragmentelor subțiri în alcool 90°, timp de 12—24 de ore. Nu se face decalcificare, orice urmă de acid distrugând fermenții: includere rapidă în parafină. Secțiunile deparafinate se trec într'o soluție 0,5—1% celoidină în alcool-eter, pentru ca fermentul să nu treacă în soluție prin tratările următoare. Lama cu pelicula de celoidină se trece în alcool 96°.

Soluții necesare: *a)* soluția 2% glicerofosfat de sodiu, în apă distilată; *b)* soluție 0,5—2% nitrat de argint; *c)* soluție 5% tiosulfat de sodiu.

Tehnica. 1) Secțiunile se trec timp de cel puțin 2 ore la 37° în amestecul: soluție (a) 1 parte, soluție (b) 1 parte, apă distilată 6—8 părți. In acest interval se formează precipitatul de fosfat de calciu; 2) pentru evidențierea precipitatului se poate întrebuința tehnica Kossa, trecând secțiunile în soluție (c) și apoi expunându-le la lumina solară timp de 5—30 de minute; 3) spălare în apă distilată; 4) fixare în soluție (d); 5) deshidratare, clarificare, montare balsam.

Rezultate. Locurile care conțin fosfataze alcaline se colorează în brun sau brun-auriu. Se poate utiliza colorarea de contrast cu: carmin alaunat, hemalaun sau Kernechtrot. Pot fi evidențiate fosfatazele alcaline în zonele de calcificare ale cartilajului sau în pericondrul embrionar, în epiteliul intestinal, epiteliul vezicii urinare, glanda mamară, epiteliul tubilor Henle din rinichi.

§ 795. — Se poate înlocui soluția de nitrat de argint cu o soluție 2% nitrat de cobalt. In această soluție secțiunile stau 5 minute. Urmează spălare în mai multe vase cu apă. Trecere prin soluție sulfat de amoniu, diluată, timp de câteva minute, în care timp fosfatul de cobalt ce s'a format se transformă în sulfit de cobalt. Urmează colorația de contrast.

Rezultate. Locurile cu fosfataze alcaline apar în negru.

Cercetarea vitaminelor prin metode histochimice.

§ 796 — **Vitamina A.** *Metoda Joyet-Lavergne (1937).* Fixarea țesuturilor în soluție Ringer, cu 15% formol, trecere la alcool și incluzie la parafină.

Reactivul utilizat: soluție saturată de clorură de antimoniu în cloroform (reactiv Carr-Price).

Metoda de lucru. Secțiunile sunt ținute în acest reactiv un timp care variază între câteva minute și trei ore. Se poate turna reactivul și pe secțiuni uscate pe lamă.

Vitamina A se găsește mai ales în nucleoli și în condriom, constituind un component obișnuit al acestora. Această întinsă prezență, admisă de autorii metodei de cercetare, nu a fost găsită de Ries. Metoda mai are încă nevoie de precizări.

§ 797. — **Vitamina C.** Szent-György a arătat că țesuturile bogate în vitamina C reduc soluția de nitrat de argint și la întuneric. Acesta este principiul de bază al metodei de cercetare a lui Giroud și Leblond (1934). In cercetare trebue să se țină seamă că vitamina C este ușor solubilă în apă și în alcool. Deasemenea se distruge prin fixatorii oxidanți.

Metode de cercetare. Metoda primă dată de autori, în care reactivul — soluția de nitrat de argint — se injecta în circulație, a fost înlocuită cu cercetarea pe fragmente de organe, nefixate.

Tehnica. 1) Fragmente mici de 2—3 milimetri, se pun în reactivul: soluție 10% nitrat de argint, cu adaus din soluții 1% acid acetic, până ce obținem pH = 3—4. Fragmentele se țin la întuneric timp de 10

minute. (Se poate utiliza şi o soluţie 1% NO_3Ag, cu adaus de 0,5% acid acetic glacial); 2) se spală în apă distilată, timp de 10—15′, schimbată de trei patru ori; 3) trecere în soluţie 5% tiosulfat de sodiu, timp de 10 minute; 4) spălare în apă distilată, preschimbată de mai multe ori, timp de 20 de minute; 5) deshidratare alcool 96°, alcool absolut, inclusiv parafină; 6) secţiunile, după deparafinare, se trec din nou în soluţie 5% tiosulfat de sodiu—5 minute; 7) spălare apă. Colorare de contrast (hemalaun, Kernechtrot sau albastru de metilen); 8) deshidratare. Montare.

Rezultate. Vitamina C apare ca precipitate negre, atât timp cât se află sub formă redusă.

§ 798. — S'a mai recomandat o metodă de evidenţiere a vitaminei C prin clorură de aur. 1) Fragmente mici proaspete, din ţesuturi, recoltate la lumina artificială, se ţin timp de 30 de minute la întuneric, în amestecul: soluţie 1% clorură de aur 20 cc, acid acetic glacial 1—2 picături; 2) spălare în apă distilată, 15 minute, deasemenea la întuneric; 3) deshidratare şi includere în parafină (deasemenea la întuneric).

Pentru a avea rezultate precise, toate soluţiile trebue să fie proaspete, precum şi băile de parafină. Deasemenea, vasele vor fi curăţite ca pentru o operaţie de impregnare. Pentru ca reacţia să fie pozitivă trebue să existe cantităţi considerabile de vitamină. Mai există şi substanţe care împiedică puterea de reducere a vitaminei C, cum ar fi glutationul, deaceea rezultatele negative vor fi mult cercetate.

§ 799. — Cu ajutorul microscopului cu fluorescenţă pot fi cercetate, pe preparate proaspete, sau secţiuni la ghiaţă din organe fixate în formol, vitaminele A, B_1, B_2, C.

HISTOCHIMIA

CERCETAREA SUBSTANŢELOR ANORGANICE

§ 800. — Generalităţi. Cercetătorul trebue să fie tot timpul atent de a nu utiliza reactivi care să producă modificări sau disolvări ale substanţelor anorganice, sau dislocări în structura histologică. Secţionarea se poate face pe piese nefixate sau, în cazul că substanţele pe care le cercetăm sunt insolubile în alcool sau benzen, se poate face o fixare în alcool absolut şi includerea în parafină. Solubilizarea lipoizilor din piesă, prin aceşti reactivi, poate să aducă o influenţă în distribuţia substanţelor anorganice, modificând structura fină citologică. Secţionarea se face la microtomul obişnuit pentru piesele incluse în parafină, în timp ce, pentru unele tehnici aplicate pe piese nefixate, secţionarea se face la microtomul cu congelare, întrebuinţând modelul Schultz-Brauns, care permite şi o răcire a cuţitului.

§ 801. — Sensibilitatea cercetării în histochimie este mult mai mare decât aceea a microchimiei. Cercetarea nu dă însă indicaţii decât asupra

prezenţei şi localizării substanţei anorganice; nu dă date asupra cantităţii şi concentrării acestei substanţe, date pe care le putem avea prin microchimie. Unitatea de măsură din microchimie este γ (gamma), care reprezintă 1/1000 din un miligram, deci 1×10^{-6} g. Această unitate este enormă faţă de unitatea de măsură a histochimiei, care este digama = $= 10^{-12}$ g. Sensibilitatea analizei histochimice depăşeşte cu mult sensibilitatea analizei spectrale. Aceasta din urmă are limita între 1/10 şi 1/100 γ, deci 10^{-1} — 10^{-2} γ, în timp ce histochimia decelează şi cantităţi de 10^{-6}. In microchimie avem un prag de sensibilitate, deosebit de pragul de evidenţă; în histochimie nu avem decât o singură limită, sensibilitatea fiind evidenţa însăşi, fiind vorba de o reacţie colorată.

§ 802. — Incinerarea ca metodă de cercetare a substanţelor anorganice. Incă din primele timpuri ale histologiei s'a propus incinerarea ca mijloc de a determina substanţele anorganice din ţesuturi, iar în timpuri mai noi s'a reluat metoda. Policard a făcut cu începere dela 1932 o lungă serie de studii pentru a stabili structura minerală, pe secţiuni, din fiecare organ (spodograma). Prin incinerare se obţine distrugerea tuturor substanţelor organice dintr'o secţiune, substanţele anorganice rămânând nemodificate în ceeace priveşte topografia şi cantitatea lor. Acesta este un deziderat la care nu se ajunge mai niciodată, producându-se mai totdeauna modificări în compunerea substanţelor minerale. Pentru incinerare se utilizează fie piese nefixate, fie piese fixate. Pentru primele se întrebuinţează microtomul cu congelare (de preferat modelul cu dispozitiv de răcire a cuţitului). Secţiuni, groase de 10—15 microni, se trec pe lame de sticlă, evitând cutele şi bulele de aer la întinderea lor. Aderarea de lamă se va face fără lichid de lipire. Cenuşa aderă destul de strâns de lamă.

§ 803. — Fixarea pieselor se poate face în soluţie 25% formol sau în alcool absolut, sau soluţie 10% formol, în alcool. Includerea în benzen-parafină permite secţiuni fine de 3—5 μ. Intinderea secţiunilor se face cu ulei de parafină, încălzit uşor, ştergându-se cu grijă resturile de ulei rămase după întindere. Preparatele nu se deparafinează înainte de incinerare. Se pot face secţiuni la congelare şi pe piese fixate.

Pentru secţiunile pieselor bogate în lipoizi se recomandă ca înainte de incinerare să fie trecute în eter timp de 3—5 ore sau în orice alt solvent al lipidelor.

§ 804. — Incinerarea se face într'un cuptor electric, cu becuri de cuarţ, într'un curent de azot. Incălzirea se face treptat, pentru a nu se produce asvârliri de picături, până ce temperatura ajunge la 500—530°. Se opreşte atunci curentul de azot şi se lasă să pătrundă aerul, producându-se astfel o oxidare a cărbunelui, prin oxigenul din aer. In preparatul obţinut nu trebue să se mai găsească nicio urmă de cărbune.

§ 805. — Preparatul obţinut se poate păstra în etuvă la 60°, pentru a împiedica umezirea cenuşii obţinută, aceasta fiind higroscopică. Poate fi acoperită cu o lamelă şi lipită cu parafină înainte de examinare, care se poate face mai târziu.

Preparatul se poate examina şi imediat, prin diferite mijloace optice de cercetare microscopică (microscopul pe fond negru) sau alte mijloace optice sau fotoelectrice. Se pot face şi cercetări de microchimie.

§ 806. — Pe preparatele obţinute se găsesc, în general, sărurile următoare: clorură de sodiu, clorură de potasiu, fosfat neutru de calciu, fosfat de magneziu, oxid feros. Din carbonaţii de calciu, sodiu, sau magneziu, prin descompunere şi degajare de CO_2, se formează oxizi de calciu, sodiu şi magneziu. Din arderile substanţelor organice se produc bioxid de sulf şi pirofosfat. Hemoglobina sângelui dă oxidul de fier (Fe_2O_3), singura substanţă colorată din cenuşă.

ARSENICUL

§ 807. — **Cercetarea arsenicului** se bazează pe formarea de cristale de hidroarseniat de cupru, care pot fi văzute pe secţiuni. 1) Se fixează fragmente de ţesături timp de 10 zile în soluţie 10% formol neutru 100 cc, sulfat de cupru 2,5o g; 2) includere în parafină; 3) secţiunile pot fi supracolorate cu metodele obişnuite: carmin, fuxină bazică sau hematoxilină eozină.

Rezultate. Arsenicul apare sub forma de cristale verzi de hidroarseniat de cupru.

AURUL

§ 808. — **Metoda Borchardt — Michaelis (1930)** se bazează pe faptul că argintul are capacitatea de a scoate aurul din sărurile respective, punându-l în libertate (argintul ar preceda aurul în seria electrolitică a tensiunilor) (Borchardt). 1) Fixarea pieselor în alcool absolut sau formol; 2) secţiunile se ţin în soluţie 5% nitrat de argint, timp de 15 minute, pe o baie de apă fierbinte, sau 12—24 de ore la 40°. Precipitatele de argint se scot cu o soluţie de 20% acid azotic.

Rezultate. Aurul apare sub forma de granule negre. Proba se face prin solubilizare în cianură de potasiu sau de sodiu, ca şi într'un amestec în părţi egale de acid azotic şi clorhidric.

§ 809. — Detectarea aurului din organe se poate face prin metoda foarte sensibilă histospectrografică, fără însă a se putea preciza localizarea.

§ 810. — **Metoda Okamoto, Akagi şi Mikami (1938).** 1) Fixare în alcool absolut sau formol neutru; 2) includere parafină sau celoidină; 3) trecere în reactivul care se prepară după următoarea formulă: soluţie saturată alcoolică de paradimetilaminobenzilidenrodamin 10-20 cc, soluţie normală acid azotic 1—3 cc, apă oxigenată 3% 5—10 cc, apă distilată 100 cc. Secţiunile stau în acest reactiv 24 de ore la 36°; 4) spălare în apă distilată; 5) colorare eventuală de contrast, cu hemalaun; 6) deshidratare alcool, clarificare xilen, montare în balsam.

Rezultate. Sărurile de aur se prezintă sub formă de granulaţii roşii-brune, neputându-se cerceta decât aurul ionizabil.

BISMUTUL

§ 811. — **Cercetarea bismutului** se face prin producerea de iodobismutat de chinină pe secţiune, sare de culoare castanie, greu solubilă. 1) Fixarea fragmentelor în formol; 2) secţiuni la ghiaţă; 3) colorarea cu amestecul în părţi egale din soluţiile: *a*) sulfat de chinină 1 g, apă distilată 50 cc, solubilizare prin adaus de picături de acid azotic (oficinal), şi *b*) iodură de potasiu 2 g; apă distilată 50 cc. După facerea amestecului, la 10 cc se adaugă încă 2 picături din soluţia oficinală de acid azotic. Se filtrează. Colorarea durează 1 minut; 4) spălarea scurtă în apă distilată cu 2 picături acid azotic oficinal la 10 cc; 5) colorarea de contrast, cu violet de genţiană; 6) trecere pe lamă. Uscare, alcool, xilen fenolat, xilen balsam.

Rezultate. Bismutul apare sub formă de granule castanii.

CALCIUL

§ 812. — **Cercetarea calciului.** Calciul se găseşte sub diferite forme în organism, fie sub formă de soluţie (lactat, clorură), fie ionizat sau ionizabil (carbonat şi fosfat), fie combinat cu alte substanţe (calciu mascat). Metodele de histochimie date pentru fiecare din aceste forme sunt destul de criticabile.

§ 813. — Pentru calciul ionizat sau ionizabil se poate întrebuinţa metoda histochimică a transformării lui în sulfat de calciu, care apare sub formă de cristale de gips. Reacţia se petrece pe lamă, unde se trece secţiunea din alcool 40° şi se acoperă cu câteva picături din soluţia 3% de acid sulfuric. Dacă există calciu ionizat sau ionizabil se produc cristale de gips care pot fi cercetate la microscop, apărând uneori în rozete. Cercetarea arată prezenţa, dar nu localizarea calciului.

§ 814. — Pentru localizarea calciului ionizat şi ionizabil se poate întrebuinţa metoda care determină formarea de lacuri colorate de calciu, cu alizarina.

1) Piese proaspete, sau fixate în alcool, sunt secţionate la ghiaţă, sau incluse în parafină şi apoi secţionate (fără a face decalcificare); 2) secţiunile se colorează în soluţie concentrată de purpurină, în alcool 70° (se poate utiliza şi o soluţie saturată apoasă), timp de 5—10 minute, până ce secţiunea se colorează puternic în roşu; 3) se trec secţiunile într'o soluţie de clorură de sodiu 0,75%, timp de 3 minute; 4) diferenţiere în alcool 70°, până nu mai cedează culoarea; 5) alcool absolut, xilen, montare în balsam de Canada.

Rezultate. In caz că avem o prezenţă bogată de calciu se formează lacuri colorate în roşu. Cantităţile mici de calciu nu se evidenţiază. Deasemenea şi alte metale, ca fierul şi metalele alcalino-pământoase, pot da lacuri colorate cu alizarina.

§ 815. — **Metoda Cretin** este mai sensibilă, putând evidenția și calciul din nucleii celulelor. Este o metodă bazată tot pe formarea de lacuri colorate de calciu.

Reactivii necesari. a) Se iau: acid galic 2 părți, trioximetilen 1 parte. Se sfărâmă și se amestecă în mojar. Din acest amestec se iau 0,25 grame și se stropesc cu atenție cu 5 cc apă distilată fierbinte, căreia i s'a adăugat 0,5 cc amoniac. Se va ține seamă că amestecul împroșcă stropi puternici. Se va mișca lateral sticla până ce soluția, roșie, la început, devine galbenă ca paiul. Dacă este roșie-brună nu se poate utiliza. *b)* Soluție saturată apoasă de sulfat de calciu. *c)* Soluție 5% amoniac, cu 1 % eozină. 1) Secțiunea se deparafinează cu xilen și se trece în cloroform; 2) se toarnă pe secțiune o mică cantitate din reactivul (a), încă călduț, și se ține 10—15 secunde; 3) se varsă excesul de reactiv și se lasă preparatul să se usuce la aer, până ce porțiunile care conțin calciu încep a se albăstri; 4) se spală preparatul cu soluția (b) filtrată; 5) se face o culoare de contrast cu soluția (c); 6) se spală repede în soluție 10% formol; 7) deshidratare în alcool absolut, clarificare în xilen. Montare în balsam de Canada.

Rezultate. Reacția este sensibilă; culoarea albastră este specifică calciului. Fondul preparatului este ros. Cu această metodă se evidențiază și alte metale, în alte culori: fierul în brun-violet, siliciul în galben, bariul și stronțiul în verde, magneziul în roz-închis, însă nu cu aceeași sensibilitate ca pentru calciu. Reactivul (a) se alterează repede și nu mai dă rezultate satisfăcătoare.

§ 816. — **Calciul solubil** (lactat, fosfat, clorură) poate fi cercetat pe piesele din procesele de osificare prin tratare cu oxalat de amoniu, care îl transformă în oxalat de calciu, de recunoscut după cristalele sale monoclinice.

Piesele sunt fixate în: *a)* amestecul în părți egale din: soluție 25 % formol neutru, soluție 4 % oxalat de amoniu; *b)* sau în soluție saturată la rece de oxalat de amoniu, căreia i s'a adăugat puțin toluen pentru a nu mucegăi.

Se formează în porțiunile din piesă care prezintă săruri solubile de calciu, cristale monoclinice de oxalat de calciu, ușor de recunoscut. Calciul sub formă de fosfat și carbonat nu este atins de reactiv. Pentru a secționa piesa, acesta trebue să fie îndepărtat. Rabl recomandă ca după tratarea piesei cu reactiv să se spele piesa de excesul de oxalat de amoniu cu acid acetic sau fosforic, căruia i se adaugă puțin formol și apoi se decalcifică.

Rezultatele sunt discutabile, fiind greu de separat perfect calciul solubil de cel precipitat, deoarece o parte din acesta din urmă se poate transforma și el în oxalat, sub acțiunea mai prelungită a soluției saturate neutră de oxalat de amoniu.

§ 817. — **Pentru calciul mascat** nu avem decât metoda incinerării, transformându-l în oxid de calciu, însă la un loc cu celelalte forme de calciu. Pentru a izola calciul din cenușă, de celelalte metale, se transformă mai întâi CaO în CO_3Ca, care este insolubil. Se spală apoi cenușa, cu grijă, cu apă caldă la 50° și se usucă din nou. In aceasta a rămas astfel numai calciul. Mai ar fi încă destule alte cauze de eroare.

CUPRUL

§ 818. — Acest metal intră în constituția pigmentului respirator dela nevertebrate. In ficat deasemenea se găsesc oarecare cantități de cupru, metal care a fost incriminat în producerea hepatitelor atrofice. Nu avem o metodă histochimică strict specifică pentru decelarea cuprului.

§ 819. — O metodă ușoară este punerea în evidență a cuprului prin ajutorul lacurilor de hematoxilină. Piesele sunt fixate în alcool 95° sau în soluție de formol 10%, având un pH = 7. Secțiunile sunt acoperite cu o soluție concentrată de hematoxilină (0,5%), având un pH = 7. Compușii cuprici se colorează în albastru sau albastru-negru. Hemosiderina se colorează în castaniu, castaniu-negru sau negru-brun. Drept control se poate face o reacție microchimică de cristalizare pe lamă, care reprezintă un test chimic, ce ne arată prezența și nu localizarea cuprului (Lison).

§ 820. — Cercetarea histospectrografică este mai sigură, însă nu permite o localizare histologică destul de precisă.

FIERUL

§ 821. — In organism fierul se arată sub mai multe forme: ionizat sau ușor ionizabil și sub formă de combinații (fier mascat). Există metode histochimice pentru evidențierea primei categorii de fier. Pentru cel mascat trebue făcute mai întâi operații de demascare, de desfacere a combinațiilor, și apoi să se aplice tehnicile respective de punere în evidență. Metoda calcinării reușește să dea tot fierul dintr'un preparat, sub formă de oxid de fier, fiind singura substanță colorată din cenușă. Limita cercetării ar fi $3{,}75 \times 7\gamma$.

Pentru evidențiere se pune o lamelă peste spodogramă și se pun pe marginea lamelei reactivii din metoda albastru Turnbull, care pătrund prin capilaritate între lamă și lamelă. Colorația maximă se produce după 12—15 ore dela adăugarea acidului clorhidric, din metodă.

In general, în metodele de cercetare a fierului se vor întrebuința instrumente de sticlă, spălate cu acid clorhidric cald, apă și alcool, pentru a nu fi introduse urme de fier din afară. Cuțitul microtomului va fi deasemenea bine spălat, mai ales după ascuțire. Se va avea în vedere încă faptul că apa distilată poate avea urme de fier dacă nu a fost distilată cu îngrijire, în vase de sticlă. Cercetarea se va face pe piese cât mai proaspete, autoliza aducând o schimbare de distribuție a fierului din

țesuturi. Piesele sunt fixate, de preferat, în soluția Bouin, acest amestec fiind bun fixator citologic și un bun păstrător al fierului (Roschin). Alcoolul absolut și formolul neutru au fost deasemenea recomandate, deși se consideră că se pierde o mică porțiune din fier, utilizând acești fixatori. Se pot face secțiuni la microtomul cu ghiață sau secționare după includere la parafină. Eterul din includerea la celoidină disolvă fierul din țesuturi, deaceea nu se recomandă această metodă de includere.

Reacțiile microchimice cele mai utilizate în histochimia fierului sunt cele care sunt la baza metodelor de mai jos.

§ 822 a. — Metoda cu albastru de Berlin. Se prepară extemporaneu amestecul din: soluție 2% acid clorhidric și soluție 2% fericianură de potasiu, în părți egale. Amestecul trebue să aibă o culoare galbenă-deschis: dacă și-a virat culoarea spre verde, nu mai este utilizabil (Roschin). 1) Se țin secțiunile în acest amestec timp de 15—30 de minute; 2) se spală apoi în apă distilată; 3) se poate face o colorare a nucleilor cu carmin acid și se montează în balsam, după deshidratare.

Rezultate. Sărurile de fier se colorează în albastru.

§ 822 b. — Compunerea reactivului mai poate fi: soluție 1% acid clorhidric 25 cc, soluție 2% fericianură de potasiu 8—10 picături. Se prepară deasemenea în momentul întrebuințării. 1) Se colorează timp de 30—60 de minute; 2) spălare îngrijită în apă și 3) colorarea nucleilor cu paracarmin sau Kernechtrot.

§ 823. — Metoda cu albastru Turnbull utilizează reacția chimică de transformare a tuturor compușilor fierului în sulfat de fier, prin tratare cu sulfură de amoniu concentrat. Fierul se evidențiază apoi ca în metoda de mai sus. Este o metodă specifică și sensibilă, care pune în evidență toată cantitatea de fier ionizabil. 1) Secțiunile din apă distilată se trec în soluție 10% sulfit de amoniu, timp de 1—24 de ore. Soluția trebue să fie galbenă și nu mai veche de 20 de zile. Se păstrează în flacoane bine închise (se poate întrebuința și soluția concentrată de sulfură, de amoniu) (Roschin); 2) spălarea în apă distilată, 10—20 de minute; 3) trecere timp de 10—20 de minute în amestecul proaspăt preparat din: soluție 20% fericianat de potasiu, soluție 1% acid clorhidric, părți egale; 4) spălare îngrijită în apă distilată; 5) colorarea nucleilor, timp de 5—20 de minute, cu Kernechtrot 0,10 g, soluție 5% sulfat de aluminiu 100 cc (soluție preparată la cald și apoi filtrată); 6) spălare, deshidratare, clarificare, montare, în balsam.

Rezultate. Granulațiile de fier se colorează în albastru-clar, nucleii celulelor în roșu.

Notă. Deoarece acidul clorhidric din comerț conține uneori urme de fier, și pentrucă fierul din secțiune ar putea trece în formă solubilă și apoi să difuzeze în țesuturi, unii autori recomandă utilizarea vaporilor de acid clorhidric. Piesele sunt trecute numai în soluție de fericianură de potasiu și apoi puse într'un vas ce are pe fund soluție de acid clorhidric, totul așezat sub un clopot de sticlă. In felul acesta acționează numai vaporii de acid clorhidric. Reacția colorată este aceeași. Fierul se colorează în albastru.

§ 824. — Cercetarea fierului se poate face și pe bloc (Tartakovsky). 1) Fragmente mici din țesuturi sau organe se fixează timp de 24 de ore în: alcool 70° 95 părți, sulfat de amoniu 5 părți; 2) suprafixare timp de 24 de ore în alcool absolut, la care se adaugă câteva picături de sulfit de amoniu; 3) spălare rapidă în apă distilată; 4) trecere în soluție 1,5% ferocianură de potasiu timp de 30 de minute; 5) apoi în soluție 0,45% acid clorhidric, timp de 10 minute; 6) spălare prelungită în apă distilată. Includere în parafină.

§ 825. — Cercetarea fierului ocult. O parte din fier, aflându-se combinat, nu se poate pune în evidență cu metodele de mai sus. El trebue să fie mai întâi demascat, desfăcut de legătură, și apoi cercetat cu una din metodele date.

§ 826. — Metoda Mac Callum ne permite să desfacem fierul din câteva combinații (hemosiderina, cromolipoizi) (Roschin). 1) Secțiunile se țin 1—2 ore la 50° sau 3—10 ore la 37°, în alcool 96°95 părți și soluție 25% acid clorhidric 10 părți. In acest amestec se disolvă sărurile de fier care nu sunt combinate cu o substanță organică, deci fierul liber. Se va cerceta apoi numai fierul combinat, care a rămas. Dacă nu este nevoie să se facă această distincție, se va trece peste acest timp al tehnicii (Roschin); 2) pentru desfacerea legăturii fierului organic se trec secțiunile timp de 30 de minute până la câteva ore în amestecul: alcool 96° 90 părți, acid sulfuric concentrat 4 părți; 3) se trec apoi secțiunile în alcool absolut și apoi în apă distilată; 4) pentru colorarea fierului demascat se trec secțiunile în amestecul, făcut extemporaneu, din părți egale de: soluție 1,5% fericianură de potasiu și soluție 0,5% acid clorhidric. In această soluție secțiunile stau 5 minute. Se spală în apă, se colorează de contrast cu carmin. Deshidratare, montare în balsam de Canada. Se poate utiliza și metoda cu albastru Turnbull.

Rezultate. Sărurile de fier sunt colorate în albastru, nucleii sunt colorați în roșu.

Se poate demasca fierul din pigmenții feruginoși ai organelor hematopoetice. De multe ori fierul din hemoglobină nu se demască.

§ 827. — Okamoto (1934) a dat o altă metodă pentru a demasca fierul din secțiuni, printr'un amestec de oxigen și clor în stare născândă. Acesta se prepară din persulfat de amoniu 30—40 g, care se disolvă în 100 cc soluție 5% clorură de sodiu. Se adaugă o mică cantitate de acid sulfuric. Soluția proaspăt preparată se păstrează la termostat la 30°. Piesele sunt fixate în alcool absolut și incluse în parafină. Secțiunile se deparafinează cu xilen și apoi se trec în alcool absolut. Se usucă la aer, pentru evaporarea alcoolului. Lamele cu secțiuni se pun cu fața în jos, într'un vas de colorat, în fundul căruia s'au pus 60—70 cc din lichidul preparat după indicația de mai sus, din care se degajează O și Cl, lăsându-se la termostat 12—24 de ore, sau până când se roșește

un fragment de hârtie albastră de turnesol, lăsată la suprafața lamei. Se aplică apoi o metodă de punere în evidență a fierului (albastru de Berlin sau albastru Turnbull) și apoi o culoare de fond cu eozină.

§ 828. — Cu această metodă se evidențiază și fierul ce se poate găsi în nucleul celulelor. Astfel s'a găsit o reacție pozitivă pentru fier în nucleii celulelor din sânge, măduva oaselor, ficat, splină, plămâni, inimă, și nu s'a evidențiat fierul în nucleii celulelor nervoase, epiteliul plat stratificat, ovocite, spermatozoizi, fibre musculare netede.

§ 829. — Mai multe metode histochimice s'au propus pentru cercetarea fosforului ocult, adică a fosforului legat cu diferite substanțe organice, dând fosfoproteidele, fosfolipidele sau intrând în compunerea nucleoproteidelor.

§ 830. — **Metoda Lilienfeld-Monti** se bazează pe următoarea tehnică: 1) secțiunile sunt cufundate, pentru 1 — 5 zile, într'un flacon bine închis, la 35°, în reactivul nitromolibdic preparat precum urmează: se disolvă o parte de acid molibdic (MoO_4H_2) în 4 părți amoniac, adăugând apoi lent 15 părți acid azotic (d = 1,2). Se lasă în repaus câteva zile și apoi se filtrează; 2) se spală apoi prelungit, pentru îndepărtarea excesului de molibdat de amoniac; 3) reducerea într'o soluție proaspătă de pirogalol 1%, timp de 15 minute; 4) colorarea fondului cu carmin; 5) deshidratare, clarificare xilen, montare în balsam.

Rezultate. Fosforul apare colorat în negru-verde. Unii autori înlocuesc reductorul pirogalic cu clorura stanoasă.

§ 831. — Alți autori întrebuințează benzidina ca reductor, obținând o colorație mai intensă decât cu clorura de staniu (Roschin). Aceeași autori pun în libertate fosforul din acidul nucleinic cu nucleaza. Această reacție servește și la determinarea acestui acid.

§ 832. **Metoda Roschin (1951).** Principiul metodei constă în întrebuințarea alcool-formolului ca fixator și a benzidinei ca reductor.

Prepararea soluțiilor. a) Soluție de molibdat. Se disolvă 0,50 g molibdat de amoniu în 20 cc apă distilată. Se adaugă 0,01 cc acid clorhidric 33%. Se complectează cu apă distilată până la 50 cc; *b*) soluție de acetat acid de benzidină: se disolvă 25 miligrame benzidină în 5 cc acid acetic glacial, complectându-se cu apă distilată până la 50 cc; *c)* soluție saturată de acetat acid de sodiu.

Tehnica. 1) Piesele se fixează în formol 1 parte, alcool 95° 2 părți. Se adaugă câteva picături de acid acetic glacial; 2) spălare prelungită în apă; 3) hidroliza fosforului organic și precipitarea fosforului liber se fac sau pe fragmente mici din piesă, sau pe secțiuni la ghiață. Se țin aceste piese în soluție (a) la temperatura de 10—12°, timp de 2—3 săptămâni. Apoi la 20—25° timp de 2—3 zile. Este nevoie de o temperatură joasă pentru a nu se modifica țesuturile. Reactivul are o aciditate mică și deaceea se face hidroliza într'un timp atât de lung; 4) se acoperă țesutul sau secțiunea cu una sau mai multe picături din soluția de benzidină (b), iar după 3 minute se adaugă 2 picături din soluția de acetat

acid de sodiu (c); 5) se montează în glicerină, în care s'au pus cristale de acetat acid de sodiu.

Rezultate. Fosforul apare colorat în albastru-intens.

MERCURUL

§ 833. — Pentru importanța în medicina legală a acestei cercetări se dau mai multe metode.

§ 834 a. — Se fixează fragmentele în alcool absolut sau în formol. Secțiunile sunt trecute în soluție 1% de difenilcarbazid. Mercurul dă un precipitat violet. Metoda este foarte sensibilă și poate fi întrebuințată și în medicina legală, pentru cercetarea mercurului în organele provenite dela cazuri de intoxicații. Piesele pot fi fixate de multă vreme în formol.

§ 834 b. — O altă metodă utilizează soluția acidă de clorură stanoasă care reduce sărurile de mercur în stare de mercur metalic, ce apar colorate în negru. Piesele sunt fixate în formol. Secțiuni la ghiață. Secțiunile se țin 10 minute la baie de apă sau 36 de ore la 56°, în soluția: soluție 5% clorură stanoasă ($SnCl_2$) 100 cc, acid clorhidric concentrat 1 cc. Colorarea fondului se face cu carmin alaunat.

Rezultate. Sărurile de mercur apar sub formă de precipitate negre (aceeași înfățișare o prezintă și sărurile de aur).

PLUMBUL

§ 835. — Sunt mai multe metode histochimice pentru a evidenția plumbul în țesuturi.

a) O primă metodă este formarea de cromat de plumb, insolubil, prin fixarea pieselor în amestecul Regaud: soluție 3% bicromat de potasiu 80 cc, formol 20 cc. Se formează cromatul de plumb, colorat în galben, care se poate recunoaște ușor. Se poate face o supracolorare a nucleilor. Dacă fixarea este bună, metoda are o specificitate satisfăcătoare.

b) Prin colorația puternică cu hematoxilină se formează lacuri plumbice de hematoxilină și astfel granulele de plumb se colorează în albastru-cenușiu. Este aceeași metodă care se utilizează la cercetarea cuprului. 1) Fixarea pieselor în alcool 95°, sau în alcool absolut; 2) includere în celoidină; 3) se colorează la cald (54°) timp de 2—3 ore într'o soluție de hematoxilină.

După Roschin, colorantul se prepară astfel: se disolvă în câteva picături de alcool absolut, sau 95°, 5—10 miligrame hematoxilină și se adaugă 10 cc din soluția 2% de fosfat de potasiu. Colorantul se prepară extemporaneu; 4) spălare prelungită (10—60 de minute), în apă, des schimbată. Deshidratare în alcool 95°, terpineol, balsam.

Rezultate. Plumbul apare în albastru-cenușiu, nucleii apar în albastru-închis; cuprul în albastru-închis; fierul anorganic și hemosiderina în negru.

§ 836. — Metoda Mc Callum. Principiu: potasiul dă cu nitritul dublu de sodiu şi cobalt ($CoNa_2(NO_2)_6$ un precipitat constituit din cristale galbene-portocalii. Dacă această culoare nu este prea vizibilă se poate transforma într'o combinaţie de amoniu, de culoare neagră, foarte vizibilă. Reactivii: *a*) se disolvă: nitrit de cobalt 20 g, nitrit de sodiu 35 g. Se poate înlocui cu nitrat de cobalt în soluţia: acid acetic 10 cc, apă distilată 65 cc. Se filtrează. După câteva ore se complectează cu apă distilată până la 100 cc, Se păstrează la răcitor, neconservându-se decât câteva zile; *b*) glicerină-amoniu-sulfit.

Se pune în amoniac (densitate 0,16) hidrogen sulfurat până ce mirosul de amoniac dispare şi este înlocuit cu cel de hidrogen sulfurat. Se ia o picătură din acest lichid proaspăt preparat şi se amestecă cu o picătură de glicerină. Tehnica: 1) se fac secţiuni la ghiaţă din piese proaspete, în aşa fel ca, încă îngheţate fiind, să fie trecute în reactivul (a). Pentru a împiedica difuzarea potasiului în ţesuturi, se recomandă să fie răcit şi cuţitul microtomului; 2) după o jumătate de oră până la câteva ore se scurge reactivul şi este înlocuit cu apă dela ghiaţă, repetându-se de câteva ori această operaţie, timp de 20 de minute; 3) se întinde apoi secţiunea bine pe lamă şi se examinează la microscop. Dacă culoarea roşie-portocalie nu se poate vedea uşor, se acoperă secţiunea cu câteva picături din reactivul (b) (glicerină-anmoniu sulfit) care colorează granulele de potasiu în negru. Se poate întrebuinţa şi glicerină cu sulfură de amoniu (50 cc glicerină 50%+ 50 cc sulfură de amoniu) (Roschin).

Rezultate. Se colorează numai granulele de potasiu în negru. Deasemenea sărurile de amoniu se pot precipita şi colora la fel, dar ele sunt solubile în apă rece şi se elimină prin spălare. Reactivul pătrunde greu în ţesuturi, deaceea răspândirea granulelor de potasiu în profunzimea preparatului este mică. Creatinina dă deasemenea o coloraţie identică cu potasiul, cu acelaş reactiv. Se poate face cercetarea pe cenuşa secţiunii, cu acelaş reactiv, în care caz este determinat numai potasiul.

§ 837. — Metoda cu Siena Orange, pentru determinarea potasiului pe secţiuni. Principiu: soluţia de natriu-paradipicrilamoniu dă un precipitat fin, cristalin, roşu-portocaliu, în contact cu potasiul. Reacţia este aproape specifică, numai amoniul mai putând da un rezultat pozitiv când este în cantitate mare. Reactivul necesar: soluţie apoasă de natriu paradipicrilamoniu, cunoscută sub numele de « soluţie Siena-Orange ». Tehnica. 1) Fixare în formol neutru, includere în parafină. Hidratarea secţiunilor în apă distilată; 2) se trec secţiunile în soluţie Siena Orange timp de 2 minute; 3) trecere în soluţie 10% acid clorhidric, 3 minute; 4) spălare în apă distilată, schimbată de mai multe ori, timp de 10 minute; 5) uscare cu hârtie de filtru; 6) montare în ulei de cedru îngroşat.

Rezultate. Ţesuturile bogate în potasiu se colorează în portocaliu. Celelalte sunt necolorate sau apar în galben-deschis. Se poate face

şi o supracolorare, de exemplu cu albastru de anilină soluţie 0,1% timp de 10 — 15 minute; după timpul (3) urmează timpii (4) şi (5) şi deshidratare cu alcool absolut, clarificare în xilen, montare în balsam sau ulei de cedru.

REACŢII HISTOCHIMICE PENTRU COMBINAŢII ORGANICE

CERCETAREA ALBUMINELOR

§ 838. — Reacţia xantoproteică, utilizată în chimia albuminoidelor, se aplică şi în histochimie, pe secţiuni de piese. Fixarea se face în amestecul alcool 96° (2 părţi) şi formol (1 parte). Secţionare la ghiaţă. Secţiunile se tratează cu acid azotic fumans, rece, câteva minute; se obţine colorarea în galben a albuminelor. Dacă se spală secţiunile în apă şi se tratează apoi cu vapori de amoniac, culoarea galbenă virează spre portocaliu. Reacţia arată prezenţa tirozinei, fenilalaninei sau triptofanului. Se produce însă şi cu alcaloizii, fenolii şi derivaţii indolici.

§ 839. — Reacţia Millon. Prepararea reactivului. Se diluează 400 cc acid azotic concentrat (densitate 1,42) cu 1,5 litri apă distilată şi se lasă în repaus 48 de ore. Se face o nouă diluare cu 2—3 părţi apă şi se adaugă cristale de nitrat mercuros la saturaţie. Se agită deseori flaconul pentru a se obţine o soluţie saturată, lucru ce îl avem în câteva zile. Se filtrează soluţia şi se adaugă, la 400 cc filtrat, 3 cc soluţie acid azotic 40% şi 1,40 g nitrit de sodiu.

Roschin dă în tehnica sa (1951) un mod mai rapid de preparare a reactivului. Se disolvă 1 cc mercur în 9 cc acid azotic concentrat şi se adaugă 10 cc apă distilată.

Tehnica de colorare. Fixarea pieselor în: *a*) amestecul soluţie 5% bicromat acid de potasiu 80 cc; formol 20 cc; acid acetic glacial 5 cc, sau în *b*) alcool absolut. Includere în gelatină sau parafină. Secţiunile se ţin 3 ore în reactivul Millon (în reactivul recomandat de Roschin se colorează la încălzire uşoară, până la apariţia reacţiei). Secţiunile se trec repede în soluţie 1% acid azotic şi repede în alcool absolut, xilen, balsam.

Rezultate. Substanţele albuminoide, sub formă de granule, se colorează în portocaliu sau roşu-cărămiziu, de diferite nuanţe. Reacţia pozitivă arată prezenţa tirozinei şi a altor aminoacizi în molecula substanţei albuminoide. Albumina glutinelor, care nu conţin tirozină, nu dă reacţia (Roschin).

Reacţia este însă pozitivă şi pentru diverşi fenoli.

§ 840. — Reacţia ninhidrinei, utilizată pentru punerea în evidenţă a produselor de desfacere ale substanţelor albuminoide, aminoacizii şi alte combinaţii chimice, în care intră radicalul $COOH - C - NH_2$ (Roschin).

Reactivul. Soluție apoasă 0,2% ninhidrină. Fixarea pieselor în formol 10%. Spălare 1 oră. Secțiuni la ghiață. Prin fixare, albuminele superioare își pierd proprietatea de a reacționa la ninhidrină, cele inferioare o păstrează.

Secțiunile se introduc în reactivul pus într'un cristalizator de sticlă și se fierb timp de 1 minut. Reactivul poate fi diluat până la de 10 ori. Urmează spălare în apă și montare în glicerină sau glicerină-gelatină.

Rezultate. Produsele de desfacere ale albuminelor (aminoacizii) sunt colorate în albastru.

Roschin recomandă și amestecul în părți egale din soluția 0,4% ninhidrină cu tampon fosfatic cu pH = 6,98.

Când fixarea este insuficientă, sau când se încălzește prea mult în timpul reacției, colorantul este absorbit și de alte structuri celulare, comportându-se ca un colorant acid.

Pe aceleași secțiuni se pot evidenția și substanțele grase, prin colorare cu Scharlach (vezi § 714), timp de 30 de minute, înainte de a se practica reacția ninhidrinei.

§ 841. — Reacția Romieu este recomandată de Roschin pentru combinațiile triptofanului. Fixarea pieselor în formol, alcool sau Bouin. Includere în parafină sau, mai bine, în celoidină. Evidențierea se face turnând o picătură de acid fosforic concentrat pe secțiune. Se acoperă cu lamela și se pune la termostat la 56°, câteva minute.

Rezultate. Substanțele albuminoide care conțin triptofan dau o colorație roșie, ce devine violetă. Preparatele nu se păstrează.

§ 842. — Reacția cu aloxan. Reactivul utilizat este o soluție alcoolică 1% de aloxan. Piese nefixate. Secțiuni la ghiață se țin în reactiv un timp mai lung la temperatura laboratorului, sau rapid la cald, în baie de apă. Se poate schimba mediul (neutralizare cu un tampon fosfatic) pentru a avea reușita mai sigură.

Rezultate. Substanțele albuminoide dau o colorație roșie sau roz.

§ 843. — Diazoreacția poate servi pentru a evidenția în genere albuminele care conțin tirozină și histidină sau pentru a decela numai histidina, dacă secțiunile au fost tratate în prealabil, la cald, cu o soluție 33% acid azotic.

Reactivul diazo. Se amestecă 2 g acid sulfanilic cu 3 cc apă distilată și cu 2 cc acid acetic glacial; se adaugă apoi, picătură cu picătură din soluția făcută, disolvând 1 g azotit de sodiu în 2 cc apă distilată. Se produce un precipitat. Se filtrează. Precipitatul se spală pe filtru. Se usucă și se redisolvă în soluție concentrată de bicarbonat de sodiu. Precipitatul trebue să fie alb. Dacă este galben nu se utilizează.

Reactivul se prepară numai la întrebuințare (Roschin).

Tehnica. Se lucrează pe piese proaspete sau fixate. Secțiunile sunt tratate cu reactivul Diazo. Se obține colorarea albuminelor, care conțin tirozină și histidină, în roșu sau portocaliu.

Prin încălzirea secțiunilor în soluție 33% acid azotic devin incapabile de a reacționa la Diazo componentele tirozinei, fără a împiedica reacția histidinei. Secțiunile se spală în apă și apoi într'o soluție concentrată alcalină (de carbonat sau bicarbonat de sodiu) până ce componentele albuminoase iau o culoare galbenă-portocalie. Secțiunile se trec pe lamă, se acoperă cu lamela și sub lamelă se lasă să pătrundă o picătură din reactivul Diazo, disolvat în soluția concentrată de sodă.

Rezultate. Componentele albuminei, care conțin histidină se colorează în roșu ca țigla.

CERCETAREA GLUTATIONULUI

§ 844. — Pentru evidențierea glutationului și în genere pentru substanțele care conțin grupul SH în celulele animale sau vegetale, s'au propus foarte multe metode. Mai toate au la bază reducerea nitroprusiatului de sodiu în mediu alcalin.

a) Secțiuni la ghiață din piese nefixate se trec în soluție 20% nitroprusiat de sodiu. Intinse pe lamă se adaugă deasupra o picătură din soluția normală de carbonat de sodiu și se acoperă cu o lamelă. Glutationul apare în violet. Culoarea se păstrează puțin, deaceea preparatul trebue examinat imediat la microscop.

b) Pentru cercetarea componenților grupului sulfhidril (SH) pe piese proaspete, secționate la ghiață, secțiunile sunt mordansate prin trecere de câteva secunde în soluție 5% acetat de zinc. După spălare în apă se trec în soluție 10% nitroprusiat de sodiu la care s'a adăugat 2% amoniac. Deshidratare alcool, xilen, balsam. Roschin recomandă trecerea în acetat de zinc după tratarea cu nitroprusiat, servind la fixarea culorii.

Rezultate. Substanțele care conțin grupul SH se colorează în roșu. Preparatele trebue ținute la întuneric și la rece, pentru a se păstra.

§ 844 a). — Lison-Rapchin propun următoarele metode:

a) Țesuturi proaspete, frotiuri sau secțiuni la ghiață. Secțiunile sunt trecute pe lamă. Se pune o picătură din soluția 2% nitroprusiat de sodiu. Pentru țesuturile vegetale soluție de 5%. Pentru întărire se adaugă o picătură din soluție saturată de sulfat de amoniu și 1 picătură amoniac. Glutationul redus apare colorat în roșu sau violet.

b) Glutationul total se obține tratând mai întâi țesutul prin o soluție 10% cianură de potasiu, timp de 9—10 minute și apoi urmând cursul reacției de mai sus. Cianura de potasiu reduce glutationul oxidat și evidențiază astfel glutationul total.

c) Dacă radicalul SH este fixat de protide, fragmentele sunt tratate de mai multe ori câte 15 minute cu o soluție 10% acid tricloracetic. Se spală în multă apă după fiecare trecere. Se urmează apoi tehnica dela punctul (a). Acidul tricloracetic este un extractor al formelor solubile și demască formele fixe. Prin această metodă nu se pune în evidență

numai glutationul, ci şi alte substanţe cu funcţia sulfhidril, zise fixe, care sunt demascate.

d) Pentru fixarea ţesuturilor se recomandă formolul sărat. Apoi se aplică metodele de mai sus. Pentru a se stabiliza reacţia se recomandă tratarea cu o soluţie de acetat de zinc.

CERCETAREA ARGININEI

§ 845. — Arginina este un acid diaminat complex, abundent mai ales în protamine. Se găseşte în cantităţi variabile în componentele albuminoase celulare. Prin reacţii histochimice nu se poate decela decât dacă se găseşte în cantităţi mari, de 15—30%, în compunerea ţesutului respectiv.

§ 845 a. — Metoda Roschin-Struve (1947). Necesar: *a*) soluţie normală NaOH, chimic pur; *b*) soluţie 40% uree, în apă; *c*) soluţie 1% α-naftol, în alcool 96°, diluată cu 10 părţi alcool 50°; *d*) soluţie apoasă 2% hipobromit de sodiu, pregătită din soluţie 5% NaOH 25 cc, la care se adaugă 0,15 cc brom. Toţi reactivii trebue să fie proaspăt preparaţi.

Tehnica. Piesele pot fi fixate în:

a) alcool 96° 2 părţi, cu formol 40% 1 parte, la care se adaugă câteva picături acid acetic glacial: fixarea timp de 12—14 ore, apoi spălare 24 de ore în apă robinet şi în urmă în apă distilată. Urmele de formol împiedică reacţia.

b) Se poate face fixarea şi în soluţie 25% formol, şi apoi spălare. Secţiuni subţiri la ghiaţă. Se trec în amestecul: 2 cc din soluţia (a) 2 cc din soluţia (c) 0,8 din soluţia (b) (amestecul trebue să fie limpede). In amestec secţiunile se ţin timp de 10—12 minute, apoi se adaugă 0,8 cc din soluţia (b) şi 0,8 cc din soluţia (d). In acest moment amestecul se colorează în portocaliu. Dacă nu s'a obţinut această culoare se mai adaugă încă 0,8 cc din soluţia hipobromit. In timpul colorării se agită uşor vasul, timp de 2—3 minute. Maximum de coloraţie se obţine în 10 minute. Preparatele se montează în glicerină.

Rezultate. Arginina se colorează în roşu-portocaliu, cu nuanţe cu atât mai intense cu cât cantitatea sa este mai mare. Coloraţia nu se păstrează decât câteva săptămâni.

§ 846. — Reacţia cu xanthidrol pentru uree. Principiu. Ureea din ţesuturi în prezenţa reactivului dă agregate de cristale aciculare, de dixantiluree, ce pot fi examinate.

Reactiv. Soluţie 6% xanthidrol, în acid acetic glacial, preparată în momentul întrebuinţării. Substanţa se păstrează la rece în borcane colorate, bine închise, deoarece se oxidează repede.

Tehnica. Fragmente mici, de ţesut renal proaspăt, de cel mult 2 mm (reactivul pătrunde greu), se pun în reactiv timp de 6—12 ore. Se spală 48 de ore în alcool absolut (xanthidrolul în prezenţa apei formează cristale care nu se disolvă în alcool). Includere în parafină, trecând prin xilen numai timp de o oră. Secţiunile pot fi supracolorate cu hemalaun.

Rezultate. Cristalele de dixantiluree sunt aciculare, de culoare galbenă-verde, aşezate în grămezi. Sunt insolubile în apă, alcool, xilen. Solubile în xilen fenolat. Locul unde sunt găsite cristalele nu poate fi considerat ca locul de producere al ureei din interiorul celulelor.

METODE PENTRU CERCETAREA ACIZILOR NUCLEICI

§ 847. — Cercetarea acidului timonucleic. Reacţie Feulgen. Se utilizează pentru punerea în evidenţă a acidului timonucleic, din celule sau substanţa vie (Lepeşinscaia).

Principiu. Acidul timonucleic poate fi descompus prin hidroliză slab acidă, detaşându-şi bazele sale purinice (guanina şi adenina) şi liberându-se acidul timinic. In acest timp, un glucid — desoxiriboza — care intră în constituţia acidului timonucleic, se eliberează şi el. Punând în contact cu reactivul Schiff aceste produse de descompunere (în care probabil există grupe aldehidice libere) apare o coloraţie roşie-violetă. Reactivul Schiff este un acid fuxinosulfonic.

Reacţia este specifică acidului timonucleic, deoarece nicio altă substanţă nu poate da coloraţia amintită cu reactivul Schiff şi după hidroliză slab acidă. Acidul timonucleic, fiind o substanţă proprie nucleului, această reacţie se numeşte şi *reacţia nucleală*. Este întrebuinţată nu numai pentru cercetarea histochimică a acidului timonucleic, dar şi ca o metodă de corelaţie morfologică a nucleului. Coloraţia se produce numai la nivelul cromatinei şi nu are nevoie de nicio diferenţiere. Structurile plasmatice şi nucleolii rămân necoloraţi.

§ 847 a. — *Reactivii necesari.* a) *Soluţie normală de acid clorhidic.* Se amestecă 36,40 cc acid clorhidric concentrat (gr. spec. 1,19) cu 100 cc apă distilată.

b) *Reactivul Schiff* (acidul fuxinosulfonic). Se freacă într'un mojar 1 gram fuxină bazică şi se disolvă cu 200 cc apă distilată clocotindă, amestecându-se circa 5 minute. Când s'a răcit la 50° se filtrează, amestecându-se cu 20 cc soluţie normală de acid clorhidric. Se răceşte până la 25° şi se topeşte în filtrat 1 g sulfit acid de sodiu anhidru. Se pune într'o sticlă cu dop bine fixat şi se lasă la temperatura camerei, la întuneric. După câteva ore lichidul începe a se decolora, putând fi utilizat după 24 de ore. Soluţia de întrebuinţat trebue să fie incoloră sau slab galbenă. Ea trebue să conţină un exces de acid sulfuric pentru a o păzi de descompunere. Când se colorează în roz-slab nu se mai poate întrebuinţa. Nu trebue să fie încălzită.

c) *Apa sulfuroasă* (apa cu SO_2). La 200 cc apă distilată sau de conductă se adaugă 10 cc din soluţie 10% sulfit acid de sodiu anhidru şi 10 cc

soluție normală de acid clorhidric. Amestecul se prepară la întrebuințare și trebue să miroasă puternic a bioxid de sulf.

§ 847 b. — *Tehnica.* Reacția se poate face pe frotiuri, secțiuni sau pe bloc. Fixarea se face pentru frotiuri prin căldură. Piesele se pot fixa în Bouin, Champy, Zenker, Helly, Flemming fără acid acetic, care au putere mare de pătrundere.

Frotiurile și secțiunile la ghiață intră în reacție numai după ce au fost trecute pentru 24 de ore în alcool 96°. Dacă nu se execută acest timp apare colorată în roșu și citoplasma, prin reacția plasmală (vezi § 850). Se poate include în parafină. Secțiunile în acest caz nu mai au nevoie de trecere prin alcool, deoarece piesele au suferit această tratare în timpul deshidratării.

Reacția de colorare. 1) Secțiuni de 10 microni, lipite cu albumină pe lamă sunt deparafinate și apoi ținute în apă distilată. Se spală mai întâi la rece în soluție normală de acid clorhidric (a) și apoi se face hidroliza la 60°, în această soluție. Operația se execută într'un pahar de sticlă de 150—200 cc, pe o baie de apă sau, mai bine, într' un termostat reglat la 60°. Totul este ca în tot timpul hidrolizei să se păstreze constantă această temperatură. Durata hidrolizei este variabilă după fixatorul întrebuințat. Se obține timpul optim prin tatonare sau se aplică recomandările date de autori. Roschin, în tehnica sa (1951) dă următoarele durate, după fixatorii întrebuințați:

Bouin-Dubosq	6 minute	Zenker-Formol	5 minute
Carnoy	6 „	Helly	8 „
Champy	25 „	Flemming	16 „

Dacă soluția din pahar se evaporează în timpul hidrolizei, se va completa cu apă distilată. 2) Se întrerupe hidroliza prin scurtă spălare a lamei cu apă distilată (scufundare în apă). 3) Colorarea în soluția fuxinosulfonică (b), pusă într'un vas de colorare cu șanțuri și capac. Dacă soluția s'a înroșit se va reînnoi. Timpul de colorare 1—3 ore. 4) Spălare în apă cu bioxid de sulf (c). Se umplu cu această soluție 3 pahare acoperite cu sticle de ceasornic, numerotându-se, pentru a fi utilizate mereu în aceeași ordine. Se lasă lamele câte 2 minute în fiecare pahar spălător.

Acest timp este de mare importanță pentru reușita colorării. Prin această spălare îndepărtăm resturile de reactiv și de fuxină liberă. 5) Spălare la apă de robinet timp de 5—10 minute. Eventuală postcolorare cu soluție slabă de verde lumină. 6) Deshidratări în seria de alcooluri, xilen, montare în balsam.

Rezultate. Substanțele care conțin acid timonucleic se colorează în roșu-violet. Cum aceste substanțe sunt mai totdeauna localizate în cromatina nucleară, avem o colorație electivă a nucleului. Citoplasma e necolorată, sau colorată în verde deschis.

Pentru controlul reacției (și al reactivilor) este necesar să facem și o probă albă. Un preparat, după o scurtă scufundare în soluție HCl rece, se trece în reactivul colorant, deci se suprimă hidroliza. In acest preparat trebue să nu fie deloc colorați nucleii.

Durata colorării pentru acest preparat de probă trebue să nu depășească 30 de minute, altfel se produce o hidroliză în însuși reactivul colorant și se obține o reacție pozitivă.

Reacția pozitivă are un prag de sensibilitate în ceeace privește concentrarea suficientă a cromatinei din nuclei. Astfel este cazul cu ouăle nefecundate, în care cromatina este prea răspândită și dă o reacție nucleală negativă.

Reacția nucleală se poate face și pe bloc, prelungind timpii operatori. Se aplică pentru piesele embrionare, care sunt mai greu de manipulat pe secțiuni. Timpii importanți și durata lor sunt următorii: fixare obișnuită, spălare în apă distilată, o primă hidroliză în soluție normală de acid clorhidric, la temperatura laboratorului, timp de $1^1/_4$ oră, urmată de hidroliză la 55°, timp de $1^3/_4$ ore. Apoi primă trecere în soluția cu bioxid de sulf timp de 15—20 de minute. Colorarea fragmentelor în reactivul Schiff timp de $4^1/_2$ ore. Spălare în soluția cu bioxid de sulf timp de 16—18 ore. Deshidratare. Includere parafină.

§ 848. — Cercetarea acidului ribonucleic. *Principiu.* Se cercetează prin compararea a două preparate (frotiuri sau secțiuni), din care unul a fost supus acțiunii ribonucleazei, care disolvă acidul ribonucleic și nu modifică acidul timonucleic.

Prepararea fermentului. 1) Ribonucleaza se obține după Roschin în felul următor: se toacă în fragmente mici pancreas proaspăt de bou, după ce a fost lăsat la aer 5—6 ore. Se adaugă soluție decinormală de acid acetic și se lasă 24 de ore la termostat la 37°. Amestecul se fierbe 10 minute și se filtrează pe hârtie. După neutralizare cu bicarbonat de sodiu se filtrează din nou. Se dializează prin săculețe de celofan 36—48 de ore, se centrifughează. In lichidul respectiv se află ribonucleaza. 2) Se poate obține fermentul și din salivă. Se filtrează aceasta și se încălzește la 80—85°, timp de 1 oră. Prin această încălzire se distrug toți fermenții salivei, în afară de ribonuclează și termostabilină (Roschin).

Tehnica cercetării. 1) Fixarea secțiunilor sau frotiurilor se face în amestec Helly. 2) Se supun secțiunile la acțiunea fermentului, la 60—65°, timp de $1^1/_2$ minute. Preparatele de comparație și control se țin în apă distilată, la aceeași temperatură, un timp egal. 3) Se colorează preparatele, atât cele tratate cu ferment, cât și cele martor, cu verde de metilpironină sau cu azur-eozină.

Rezultate. Din compararea preparatelor, ținând seamă că ribonucleaza face să dispară acidul ribonucleic, se pot cerceta cei doi acizi nucleinici. Celulele embrionare, țesuturile în regenerare, ca și tumorile maligne, sunt bogate în acid ribonucleic.

§ 849. — **Metoda Turchini** (Roschin 1951), *pentru acizii nucleici.* Prin această metodă se face posibilă diferențierea grupărilor glucidice din cei doi acizi nucleinici, adică a *d-ribodesozei* și a *d-ribozei*, respectiv din acidul timonucleic și ribonucleic.

Reactivul. In 100 cc alcool 95° se adaugă 15 picături acid sulfuric concentrat și apoi se disolvă 80 miligrame metil — sau feniltrihidroxifluoron ($C_{19}H_8O_2$).

Tehnica. Fixare în amestec Bouin, includere în parafină. *a*) Dacă se utilizează reactivul metiltrihidroxifluoron se face hidroliza la 60°, în soluție normală de acid clorhidric, pe secțiuni deparafinate. Timpul hidrolizei: 5 minute.

După scurtă clătire în apă, apoi în alcool, se tratează cu reactivul, timp de 5—10 minute. Spălare rapidă în alcool 90° (câteva picături), apoi cu soluție 1% carbonat de sodiu. Spălare rapidă în apă. Deshidratare, xilen-balsam. *b*) Dacă se întrebuințează reactivul feniltrihidroxifluoron, hidroliza se face la rece, în sol. 25% acid clorhidric, disolvat în alcool 90°, timp de 3—5 minute; ceilalți timpi ai tehnicii sunt identici.

Rezultate. Ribodesoza (acidul timonucleic) se colorează în albastru-violet, iar riboza (acidul ribonucleic) se colorează în galben-roz.

§ 850. — **Reacția plasmală. Cercetarea acetalfosfatidelor.** In practicarea reacției nucleale s'a observat că atunci când se lucrează cu secțiuni care nu au suferit acțiunea alcoolului (cum ar fi secțiunile dela congelare) se produce o puternică colorare în roșu a citoplasmei. Deci există aci o substanță care este capabilă să readucă culoarea în reactivul fuxinosulfonic. Această substanță a fost numită *plasmal.* Ea este solubilă în alcool, sau este unită cu o substanță care are această solubilitate, deaceea nu apare pe secțiunile tratate cu alcool. Componentul cu care este unită este de natură lipoidică. Acest complex a fost numit *plasmalogen.* S'a găsit că plasmalogenul nu este decât un amestec de acetalfosfatide, constituite din legături acetalice între acidul glicerofosforic și aldehidele acizilor grași superiori (palmitic și stearic). Plasmalul însuși ar fi un amestec de aldehide al acestor acizi grași.

Plasmalogenul nu dă reacția Schiff, însă prin acțiunea sublimatului se desface în plasmal, care pozitivizează această reacție. Prin hidroliză prelungită (câteva ore în sol. decinormală de acid clorhidric) sau numai prin însăși aciditatea reactivului Schiff, când se prelungește contactul, deasemenea se desface în plasmal și dă culoarea roșie caracteristică cu reactivul.

Feulgen înțelege prin « reacția plasmală » coloratia violetă care apare prin reactivul Schiff, după tratarea pieselor cu sublimat, deci punerea în evidență a acetalfosfatidelor (plasmalogen).Nu se va confunda reacția plasmală cu reacția nucleală, pentru cercetarea acidului timonucleic, căci, deși ambele utilizează reactivul sulfofuxinic, în reacția nucleală acțiunea reactivului este precedată de o hidroliză acidă, care constitue un timp esențial din această cercetare.

§ 850 a. — *Tehnica reacției plasmale.* Fixarea pieselor se face numai când friabilitatea lor împiedică secționarea, sau pentru colorarea plasmală pe bloc. In fixator trebue să intre sublimat sau clorură de platină, săruri de cadmiu, uneori nitrat de uran. O formulă de fixator este: formol 20% — 30 cc, soluție 1% sublimat 1 cc, soluție 1% sulfat de cadmiu 10 cc, timp de 24 de ore, după care se spală în apă curgătoare 24 de ore. Cristalele de sublimat *nu* se scot prin tinctură de iod.

Se poate utiliza numai soluție 1% clorură de platină pentru piese subțiri de 3—4 mm. Acest fixator nu dă precipitate. Sărurile de crom și osmiu, fiind oxidanți puternici, nu se întrebuințează ca fixatori. Formolul poate fi utilizat dacă secțiunile sunt trecute în soluție 1% sublimat timp de 5 minute și apoi în apă distilată. Alți autori nu recomandă fixatori care să conțină aldehide. De regulă se lucrează pe piese proaspete, secționate la ghiață sau pe frotiuri. In niciun caz nu se lucrează pe piese incluse în parafină, alcoolul distrugând plasmalul.

Colorare. 1) Secțiunile sunt trecute într'o soluție 1% sublimat timp de 3 minute. O parte din secțiuni se trec numai în apă distilată, pentru a servi de martor. 2) Secțiunile care au fost în sublimat se spală în apă distilată. 3) Ambele serii de preparate se trec în acelaș timp în reactivul fuxinosulfonic. Pe preparatele care au fost în sublimat apare curând culoarea violetă. Preparatele martor nu se colorează decât după un timp îndelungat, când sub acțiunea însăși a reactivului se desface plasmalogenul și produce apariția culorii. Deci cercetarea plasmalogenului se face și după evaluarea timpului de apariție a culorii. 4) Montarea preparatului se face în glicerină, sirop Apathy sau apă cu bioxid de sulf.

Preparatele se țin la întuneric, fiind sensibile la lumină, cercetarea făcându-se imediat și rezultatele sunt consemnate pe film sau desene, deoarece preparatele nu se conservă.

Din piesele care au fost fixate în amestecul dela § 850 a, se fac secțiuni la ghiață de 25 microni, care se trec, din apă distilată, în apă cu bioxid de sulf, timp de 5 minute. Se țin apoi 15 minute în reactivul fuxinosulfonic. Aci nu avem martor. Culoarea apare repede în prezența acetalfosfatidelor, recunoscându-se și macroscopic.

Ca și în tehnica pentru acidul timonucleic, se fac și aci trei treceri, de câte 5 minute, prin apă cu bioxid de sulf, pentru îndepărtarea excesului de colorant.

După spălare în apă distilată, treceri prin seria de alcooluri, fără alcool absolut, xilen fenolat, xilen. Montare în balsam. Prin această montare se obține o ameliorare asupra montării în glicerină, dar se pierde o parte din acetalfosfatide. Numai o parte din plasmal se evidențiază, cel sensibil este spălat.

Se poate face supracolorare cu soluție 1% verde de metil, înainte de deshidratare.

Rezultate. Plasmalul (acetalfosfatidele) apare în violet.

§ 850 b — **Colorarea plasmală pe bloc** s'a recomandat mai ales pentru embrioni, eventual se poate utiliza pentru toate piesele. Se face întâi reacția și apoi includerea, pentru a pierde mai puțin din substanțele de cercetat.

Fixarea în sublimat, după una din formulele date. Piese subțiri, de 2 mm, se țin în apă cu bioxid de sulf timp de 2 ore. Apoi 2 ore în reactivul Schiff. Se spală timp de 15 ore în apă cu bioxid de sulf, care se schimbă de mai multe ori.

Pentru pregătirea includerii se ține câte 1 oră în alcool 70°, 95° și absolut. Se recomandă includerea prin trecere în benzoat de metil-celoidină, benzen, parafină.

CERCETAREA DERIVAȚILOR FENOLICI

§ 851. — **Metoda Lison** (1931) pentru orto- și parafenoli, prin diazoreacție. Reactivul Diazo se prepară comod plecând dela substanța în pulbere. Soluția se face în momentul întrebuințării, punându-se o mică cantitate din substanță în apă distilată, răcită prin ghiață, la 5°. Se alcalinizează prin soluție de carbonat de litiu. Reactivul ia o culoare gălbuie. Soluția trebue întrebuințată în zece minute. Secțiunile se țin în reactivul Diazo, preparat ca mai sus, timp de cel mult 1/2 minut. Spălare rapidă cu apă. Seria de alcooluri, xilen, balsam.

Rezultate. Derivații fenolici apar colorați în roșu-brun-lucios, pe un fond galben-difuz.

§ 851 a. — *Prin indoreacție* se obțin rezultate mai puțin satisfăcătoare pentru derivații fenolici.

Piesele sunt fixate în formol neutru sau Bouin. Se utilizează soluție 1% dimetilparafenilendiamină cu adaus de câteva picături dintr'o soluție slabă de bicarbonat de potasiu.

Rezultate. Derivații fenolici se colorează în verde, apoi în albastru.

§ 852. — Reacțiile: *cromofină* (§ 1023) și *argentofină* (§ 999), utilizate în tehnicile generale, sunt tot reacții histochimice bazate pe proprietățile reductoare ale di- și polifenolilor, în poziția orto și para, aflați în celulele din piesele respective.

§ 853. — **Cercetarea substanței cromotrope.** Substanța cromotropă este constituită dintr'un amestec de esteri ai acidului sulfuric, multimoleculari, cum ar fi acidul condroitinsulfuric și acidul mucoitinsulfuric. Acestea se găsesc mai ales în substanța fundamentală a cartilajului, în pereții vaselor, uneori în carne și mai ales în organismul embrionar. Evidențierea se face printr'o reacție care este la limita dintre metodele colorante și cele histochimice. Fixarea se face în soluție 4% acetat bazic de plumb. Soluția trebue să fie proaspăt preparată, fie din substanță în pulbere, fie din soluție de subacetat de plumb pro analysi, pentru a nu se produce cristale la fund. Alți fixatori scad colorabilitatea

substanței cromotrope. Fixarea durează 12—24 de ore. Urmează spălarea în apă. Deshidratare. Includere în parafină.

Colorarea secțiunilor de 5 microni se face în soluție 1% apoasă de albastru de toluidină, timp de 15—30 de minute.

Diferențiere rapidă în alcool 95°; apoi în alcool absolut, xilen, balsam.

Rezultate. Substanța cromotropă este colorată prin metacromazie, în roșu-violet. Nucleii sunt colorați în albastru.

SÂNGELE ȘI ORGANELE HEMATOPOETICE

§ 854. — In ultimii douăzeci de ani, cunoașterea unei serii întregi de boli a făcut progrese uimitoare grație studiului in vivo al modificărilor produse în sânge și organele hematopoetice, grație punctiilor și punctiilor biopsie, apărute după ce Arinchin (1927) a introdus în clinică examenul măduvei hematogene prin punctie sternală.

Produsele recoltate pot fi examinate între lamă și lamelă, cu sau fără colorație vitală sau la microscopul cu contrast de faze, pe frotiuri fixate și colorate, sau pe secțiuni, după includere prealabilă.

§ 855. — Studiul sângelui între lamă și lamelă oferă clinicii în general puține date, el este însă de un real folos în cercetarea științifică. Picătura de sânge — făcută incoagulabilă cu ajutorul unui ingredient apropiat (citrat, oxalat, heparină, hirudinină, arseno-benzeni) — se pune între lamă și lamelă, iar preparatul se lipește (§ 526—527). Datele cele mai interesante le oferă microscopia prin contrast de faze, care scoate în evidență aspectul în spațiu al elementelor sângelui, aducând, în multe cazuri, lămuriri importante.

§ 856. — Sângele făcut incoagulabil poate fi colorat înainte de examinare cu un colorant vital (vezi acolo).

§ 857. — Examenul cel mai utilizat este însă cel pe frotiuri și pe secțiuni. Metodele care vor fi indicate în cele ce urmează pentru colorarea produselor de punctie sunt valabile în cea mai mare parte și pentru fragmentele de țesuturi recoltate experimental sau la necropsie, ca și pentru amprentele din organe făcute în aceleași ocazii.

§ 858. — Se recomandă în general să se întindă din produsele de punctie 10—12 frotiuri după metoda clasică, dintre care o parte vor fi colorate imediat, iar altele vor fi păstrate pentru tehnicile speciale, eventual necesare.

§ 859. — Recoltarea sângelui este preferabil să fie făcută dimineața. Este indiferent pentru examenul hematologic dacă bolnavul a mâncat sau nu. Intr'adevăr, în cursul întregii vieți a omului, acesta își ia masa de dimineață de obicei la aceeași oră și fără variații prea mari în compoziția sa. Aceste două elemente repetate zilnic timp îndelungat (masa și

este întreținut mereu, nu există pericolul stingerii sale, așa încât omul are practic dimineața, indiferent dacă a mâncat sau nu, o aceeași reacție umorală și hematologică, grație reflexului-orar. De altfel, examene comparative făcute la oamenii sănătoși, dimineața pe nemâncate sau pe mâncate, au demonstrat existența unor variații minime care de multe ori intrau în limitele de eroare ale metodei de cercetare.

§ 860. — **Frotiul de sânge** se întinde astfel: cu o lamă degresată se ridică prin atingere o picătură de sânge din pulpa degetului sau din lobul urechii (sau picurată din acul de puncție). Cu o lamelă sau o lamă șlefuită, mai îngustă decât prima, se atinge picătura, care în urma câtorva mișcări se întinde, aderând în spațiul unghiular format între lama și lamela afectată. Menținând lamela într'un unghi de 45° și fără a o ridica de pe lamă, se conduce lamela cu viteză uniformă dela dreapta spre stânga, în așa fel încât sângele să se întindă formând o dâră de lățimea lamelei și având două margini.

§ 861. — Frotiurile astfel întinse se usucă prin agitare la aer, la temperatura camerei (a se evita încălzirea sau uscarea la soare). Dacă nu sunt colorate imediat, lamele se păstrează cu frotiul în jos sau împachetate, ferite de lumină. Este totuși preferabil ca frotiurile să fie colorate cât mai curând după ce au fost întinse.

§ 862. — După colorarea frotiurilor, acestea pot fi de cele mai multe ori acoperite cu balsam de Canada sau ulei de cedru și lamelă. Pentru marcarea câmpurilor se poate folosi cu ușurință vârful unui ac cu care se practică o zgârietură în apropierea lentilei frontale a obiectivului. Pe locul preparatului se face sub lupă un cerc de tuș negru, ceva mai mare.

§ 863. Preparatele colorate nu trebue curățate de ulei de cedru, după examinare, cu degetul, cu vată sau cu cârpa, pentrucă se produc zgârieturi pe frotiu. Cel mai bine este să fie introduse lamele într'un pahar cu benzen, toluen sau xilen care disolvă uleiul de cedru. Lama curățată se usucă prin agitare la aer.

COLORAREA FROTIURILOR ȘI AMPRENTELOR

§ 864. — Orice preparat trebue colorat pentru început cu colorantul lui Romanovschi-Giemsa sau după metoda panoptică a lui Pappenheim. Această ultimă colorație este obligatorie pentru orice examen hematologic. Astăzi această metodă este cea care dă cele mai bune rezultate, având o utilizare universală.

Dacă primul examen a demonstrat existența unei anemii, este necesar să fie colorate reticulocitele, iar în caz de leucemie, evidențierea peroxidazelor în leucocite permite diferențierea lor și clasificarea leucemiei.

ca fixator al frotiului alcoolul metilic, iar drept colorant azurul de metilen și eozina.

Frotiurile se fixează într'un vas cu alcool metilic timp de 5 minute. Pentru a împiedica evaporarea — alcoolul metilic putând fi utilizat de mai multe ori — vasul trebue acoperit. După fixare, frotiurile se scurg și se usucă fără să fie spălate.

Frotiurile fixate se pun cu fața în jos într'o cutie Petri sau Laveran sau într'un cristalizor pe bucățele de chibrit sau pe baghete de sticlă. Sub frotiuri se introduce colorantul în cantitate suficientă pentru a veni în contact cu ele. Coloratia durează 15—30 de minute, după care frotiurile se spală cu apă curgătoare și se usucă la aer.

Pe frotiurile colorate cu Romanovschi-Giemsa eritrocitele apar colorate în galben-roz, citoplasmele sunt albastre la limfocite, plasmocite și monocite și roz la bazofile, eozinofile și neutrofile. In neutrofilele normale nu se observă granulații, iar în bazofile acestea apar șterse. Nucleii sunt violacei.

§ 866. — Soluția-mamă a colorantului Romanovschi-Giemsa are următoarea compoziție: azur II — eozină 3 g, azur II 0,8 g, glicerină pură (d = 1,26) 125 g, alcool metilic 375 cc. Soluția se găsește gata preparată.

§ 867. — Pentru colorare, această soluție se diluează în proporție de 1/2—1 pic. la 1 cc apă tamponată. Se utilizează pentru diluție apă distilată sau numai fiartă la care se adaugă în proporție de 1—5% soluție tampon de fosfați = 7,2.

§ 868. — Soluția tampon concentrată are următoarea compoziție: KH_2PO_4 0,49 g, Na_2HPO_4 1,14 g, H_2O 200 cc. pH-ul soluției este 7,2.

§ 869. — **Metoda panoptică** este o complectare a metodei Romanovschi-Giemsa; rezultatele ei sunt mult mai bune, neputând fi egalate pentru examenele de măduvă. Această metodă utilizează un timp inițial nou, al doilea timp fiind însăși colorarea după metoda Romanovschi-Giemsa.

Primul timp colorează mai ales elementele acidofile și granulațiile neutrofile ale leucocitelor, cel de al doilea colorează nucleii și componentele azurofile.

Frotiurile se colorează în cutii Petri, Laveran sau în cristalizoare, care pot fi acoperite pentru a se evita evaporarea alcoolului metilic din colorantul May-Grünwald.

§ 870. — Soluția May-Grünwald se găsește gata preparată sau sub formă de pulbere de eozinat de albastru de metilen, care se disolvă pentru utilizare 0,25 g la 100 cc alcool metilic pur și neutru.

§ 871. — Timpii coloratiei sunt următorii: 1) sol. May-Grünwald 3 minute (12—15 pic. sunt suficiente pentru a acoperi frotiul). Soluția realizează fixarea frotiului și colorarea anumitor componente celulare; 2) fără a scurge, se adaugă la colorant aceeași cantitate de apă distilată, eventual tamponată. Se lasă un minut. Soluția astfel diluată se

comportă numai ca un colorant; 3) colorare în soluție Romanovschi-Giemsa, diluată și tamponată la pH = 7,2 ca mai sus, 15—30 minute; 4) spălare la apă curgătoare, uscare la aer, examen la imersie.

§ 872. — *Colorarea reticulocitelor* pune în evidență reacția regenerativă a organismului la scăderea numărului de eritrocite din sângele periferic, produsă de o cauză oarecare. Colorarea reticulocitelor se face cu o soluție alcoolică 0,5% de albastru briliant de crezil.

Colorarea se poate face după două metode: 1) se amestecă într'o eprubetă câteva picături de sânge cu soluția colorantă și se întind apoi frotiuri cu acest amestec. In acest caz se întind în prealabil frotiuri cu albastrul de crezil și după uscare; 2) peste acesta se întinde frotiul de sânge; 3) fiind vorba de o colorație vitală, în acest din urmă caz, frotiurile trebue ținute 30 de minute într'un mediu umed. Aceasta se realizează așezând pe fundul unui cristalizor sau al unei cutii Petri o hârtie de filtru udă, peste care se pun bețe de chibrit sau baghete de sticlă pe care se așează frotiurile.

După colorare acestea pot fi examinate ca atare la imersie sau mai bine se supracolorează frotiurile după metoda panoptică (cu timpul 3 prelungit până la 45—60 de minute). Rezultat: în reticulocite apare o rețea pe fondul eritrocitului.

§ 873. — **Peroxidazele** pe frotiuri de sânge sau pe amprente se pun în evidență cu ajutorul reactivului benzidinic (soluție-mamă alcoolică 2% de benzidină).

Frotiurile: 1) se fixează cu alcool-formol 5/1 timp de cinci minute; 2) se spală bine cu apă de robinet; 3) se acoperă apoi câteva secunde cu soluția de benzidină preparat astfel: se toarnă într'o eprubetă 2—3 picături din soluția-mamă și se diluează cu apă distilată până la disolvarea complectă a cristalelor aciculare de benzidină (necesari cca 20 cc); 4) se picură apoi 2—3 pic. H_2O_2, se amestecă. Pe frotiu se observă degajarea bulelor de oxigen; 5) se spală apoi bine lama, 6) după care se colorează cu Romanovschi-Giemsa timp de 45—60 de minute. Granulele de peroxidază apar colorate în brun.

§ 874. — Pentru punerea în evidență a peroxidazelor în eritroblaști se procedează astfel: 1) frotiurile sunt fixate în alcool metilic; 2) colorarea se face cu 2 cc din soluția-mamă de benzidină la care se adaugă în momentul folosirii 5 cc de perhidrol alcoolic (0,5 cc perhidrol 30% în 4,5 cc alcool 70%). Colorarea cu acest reactiv durează 5 minute; 3) apoi frotiurile se spală cu apă; 4) se usucă și se colorează după Romanovschi-Giemsa 45—60 de minute. Hemoglobina apare colorată în brun, eritrocitele și eritroblaștii sunt intens pozitivi (granulații brune-verzi-peroxidaze), proeritroblaștii negativi, eozinofilele slab pozitive.

§ 875. — In monocite, peroxidazele se pun în evidență în mod indirect. Ele fiind pozitive la reacția cu benzidină pe frotiul proaspăt, pentru diferențierea monocitelor de celelalte elemente care ar conține peroxidaze se colorează frotiuri păstrate la uscăciune, nefixate, timp

de 5—6 săptămâni. In acest moment, peroxidazele din monocite au dispărut, astfel încât acestea pot fi net diferențiate de elementele granulocitare care și-au păstrat încă peroxidazele.

§ 876. — In eozinofile, peroxidazele se pun în evidență cel mai bine astfel: 1) se colorează frotiurile cu May-Grünwald ca în metoda panoptică (§ 869), iar 2) la colorantul diluat Romanovschi-Giemsa se adaugă de fiecare 10 cc colorant câte 1 cc soluție de benzidină diluată. Cu această metodă, toate celelalte peroxidaze nu apar.

§ 877. — **Colorarea bazofilelor** se face cu scopul de a diferenția granulocitele bazofile de mastocitele tisulare. Frotiurile se fixează și se colorează în același timp, 5 minute, cu o soluție de albastru de toluidină 1% în alcool metilic (soluția se păstrează indefinit). După colorare, frotiurile se spală la robinet și se usucă la aer. Granulațiile bazofilelor apar colorate metacromatic în roșu-violet. Celelalte celule apar colorate în albastru-deschis. Granulațiile toxice din neutrofile, cele ale promielocitelor, monoblaștilor și trombocitele apar colorate tot metacromatic, dar mult mai slab, așa încât confuzia nu este posibilă. Mastocitele tisulare nu au afinitate pentru acest colorant.

Pe frotiurile de măduvă hematogenă sau pe amprentele de organe hematopoetice se poate pune în evidență *reticulul fibrilar* prin impregnație argentică după metoda Gömöri (§ 910).

§ 878. — Pentru *corpii eritrocitari* care se întâlnesc în unele anemii hemolitice cu methemoglobinemie și sulfhemoglobinemie, colorația se face ca și pentru reticulocite (§ 872), utilizându-se însă o soluție de 0,5% de sulfat de albastru de Nil în alcool absolut. Corpii eritrocitari apar colorați în albastru-închis, iar eritrocitele în galben-verzui.

§ 879. — **Colorarea grăsimilor** în elementele sanguine se face cu ajutorul soluției de Sudan III (vezi preparare la § 721). Colorare: 1) frotiurile se fixează 15 minute în formol 1/10; 2) se spală bine cu apă curgătoare; 3) se clătesc de trei ori cu apă distilată și se așează vertical în stativ să se scurgă; 4) frotiurile sunt ținute apoi 6—8 ore la temperatura camerei în soluție de Sudan III, după care 5) se spală repede cu apă distilată; 6) se colorează 15—20 de minute în hemalaun; 7) spălare în apă curgătoare cel puțin 30 de minute, apa se scurge și 8) se montează umed în glicerină-gelatină sau sirop.

Eozinofilele apar puternic colorate în portocaliu, ca și neutrofilele, care prind însă colorantul ceva mai puțin intens. Monocitele conțin cantități variabile de grăsimi. Sunt negative bazofilele, limfocitele, megacariocitele, trombocitele, plasmocitele și eritrocitele.

§ 880. — **Acizii nucleici** din elementele sângelui se pun în evidență prin metoda Feulgen (§ 847).

§ 881. — **Siderocitele** se pun în evidență în frotiuri cu metoda următoare: 1) frotiurile se fixează 5 minute în alcool metilic, apoi 2) se usucă fără spălare prealabilă; 3) se acoperă apoi frotiurile timp de 2—3 minute cu o soluție clorhidrică de ferocianură de potasiu preparată prin disol-

varea a 1 g ferocianură de potasiu în 100 cc acid clorhidric diluat (1 parte HCl 25% şi 99 p. apă); 4) spălare în apă distilată; 5) colorarea fondului cu o soluţie de eozină 2—3 minute, clătire rapidă, uscare. Fierul apare colorat în albastru.

§ 882. — Plasmocitele se colorează electiv cu verde de metil-pironină (§ 640).

§ 883. — **Picătura groasă** permite evidenţierea paraziţilor sarguini într'o cantitate mai mare de sânge. Acest examen nu trebue să excludă însă efectuarea de frotiuri, pe care elementele apar bine întinse. Picătura groasă se obţine prin plasarea *la mijlocul lamei* (şi nu la cele două capete) a câtorva picături de sânge din pulpa degetului. După uscare, se hemolizează picătura cu apă distilată, cu lichidul lui Rüge (acid acetic gl. 1 cc, formol 40% 2 cc, apă distilată q.s.p. 100 cc) sau chiar cu soluţia Giemsa diluată care se pune pe preparatul nefixat. După deshemoglobinizare, preparatul se colorează cu Giemsa diluat 25 de minute. Colorantul trebue turnat cu grijă, pentru ca să nu se desprindă picătura. In cazul în care deshemoglobinizarea se face chiar cu soluţia colorantă, aceasta trebue înlocuită mereu, pe măsură ce se umple cu hemoglobină, iar coloraţia trebue continuată cu ultima porţiune proaspătă de colorant încă 25 de minute. Paraziţii malariei apar coloraţi în albastru, cu nucleii în roşu, tripanosomele apar albastre cu flagelul roşu.

COLORAREA SECŢIUNILOR DE ORGANE HEMATOPOETICE

§ 884. — Pentru fixarea organelor hematopoetice sau fragmentelor din ele se folosesc de preferinţă amestecuri cu bicromat şi sublimat (îndeosebi Maximov sau Helly § 243 şi 244) sau Susa (§ 238). Deasemenea se pot face secţiuni şi din ţesuturile extrase prin puncţie pentru care se folosesc fixatorii de mai sus sau fixatori anhidri (evitându-se în acest fel prea multe manipulări cu aceste fragmente mici).

§ 885. — Secţiunile din splină, ganglioni şi măduvă hematogenă se colorează cu metodele obişnuite: hematoxilină-eozină, picrofuxină, coloraţii tricromice (mai ales Masson), etc. Reticulul fibrilar se pune în evidenţă cu metoda Gömöri (§ 910).

§ 886. — Colorarea elementelor sanguine pe secţiunile din aceste organe se face cu o modificare a metodei panoptice.

Inainte de colorare secţiunile fixate în Maximov, Helly sau Susa sunt bine clătite în alcool pentru a scoate toate urmele de sublimat (nu se foloseşte soluţia iodo-iodurată, care nu mai permite colorarea ulterioară). Pentru colorare, secţiunile 1) se introduc într'un vas cu May-Grünwald diluat 1/8 în apă distilată şi se ţin la termostat la 37° timp de 20 de minute. De aci 2) secţiunile se trec direct într'un alt vas cu soluţie diluată Romanovschi-Giemsa (1 pic. la 1 cc apă tamponată la pH = 7,2) şi se ţin la termostat la 37°, 15 minute; 3) se clătesc apoi cu apă şi cu apă distilată uşor acidulată cu 1 pic. acid acetic; spălare din nou în

apă distilată, uscare pe hârtie de filtru; 4) controlând mereu sub microscop se face apoi diferenţierea şi deshidratarea într'o serie de amestecuri: *a*) xilen 5 p. + acetonă 95 p.; *b*) xilen 30 p. + acetonă 70 p.; *c*) xilen 70 p. + acetonă 30 p.; *d*) xilen. Montare în ulei de cedru.

§ 887. — In ţesuturi, altele decât cele din organele hematopoetice, elementele de proveniență sanguină sau hematopoetică în general se pun în evidenţă cu metodele curente, cu metoda panoptică pentru secţiuni (§ 886), cu verde de metil-pironină (§ 640).

§ 888. — **Mastocitele tisulare** se pun în evidenţă cu uşurinţă pe piese fixate în acetat de plumb 4% (soluţia fixatoare se prepară prin disolvarea extemporanee a acestuia în apă, sau prin diluţia soluţiei-mamă de acetat de plumb officinală 19%). Fragmentele mici se fixează 24 de ore, apoi sunt spălate în apă şi incluse în parafină.

§ 889. — Colorare. Secţiunile se colorează o oră, unele cu o soluţie apoasă de 1% de albastru de toluidină şi altele cu o soluţie 1% de albastru de toluidină în alcool 60%. Mastocitele sunt colorate împreună cu celelalte elemente de către soluţia apoasă, în timp ce soluţia alcoolică le colorează electiv.

§ 890. — **Fibrina** din procesele inflamatorii se colorează frumos în roşu cu tricromicul Masson (§ 905). O metodă utilizată curent pentru fibrină este cea elaborată de Weigert.

Secţiuni de parafină, celoidină sau ghiaţă, după orice fixare. (Dacă fixarea s'a făcut în amestecuri cromate, secţiunile se trec 10 minute printr'o soluţie 0,3% de hipermanganat de potasiu şi, după spălare, 2—3 ore în acid oxalic 5%; apoi spălare în multă apă).

Colorare. 1) Nucleii se colorează cu carmalaun, Kernechtrot sau coloranţi similari; 2) spălare şi clătire cu apă distilată; 3) uscare pe hârtie de filtru; 4) secţiunile se acoperă 15 secunde cu violet de genţiană anilinat (la 100 cc apă de anilină preparată prin agitarea a 5—10 cc aminobenzen în 100 cc H_2O şi filtrare se adaugă 11 cc soluţie saturată de violet de genţiană sau violet de metil în alcool 96%), apoi se usucă; 5) se clăteşte 15—20 de secunde secţiunea cu soluţie iodo-iodurată (se disolvă 2 g KI în 5 cc apă distilată, se disolvă în aceasta 1 g iod şi apoi se diluează cu apa la 300 cc); 6) scurgere şi uscare; 7) diferenţierea se face într'un amestec 1/1 de aminobenzen (ulei de anilină) şi xilen, până când fibrina apare distinct violetă, în timp ce restul ţesuturilor se colorează mai mult sau mai puţin palid; 8) se scoate apoi aminobenzenul cu xilen şi se montează în balsam de Canada.

Metoda aceasta nu este electivă. Diagnosticul fibrinei se pune pe baza coloraţiei, dar mai ales pe aspectul histopatologic.

ŢESUTUL CONJUNCTIV

§ 891. — Metodele de studiu pentru ţesutul conjunctiv trebue să evidenţieze, pe cât posibil, toate elementele acestuia: diferitele celule

şi fibrilele. Studiile făcute în ultimii ani au arătat că diferitele celule ale conjunctivului (histiocit, celulă rotundă, poliblast, celulă ragiocrină, fibroblast, macrofag, etc.) nu reprezintă în realitate decât diferite faze histofiziologice ale unuia şi aceluiaş element conjunctiv. Deasemenea, studiul evoluţionist al fibrilelor conjunctive a arătat că acestea îşi au origina atât în celula conjunctivă, cât şi în substanţa fundamentală care se fibrilizează. In evoluţia lor aceste fibrile încep prin a avea un grad accentuat de argentofilie, impregnându-se la un pH apropiat de neutralitate, în care stadiu sunt cunoscute ca fibrile de reticulină; apoi fibrele devin din ce în ce mai acidofile, colorându-se la un moment dat cu coloranţii anilinici, la un pH în jurul lui 4 şi într'un stadiu şi mai avansat devin intens fuxinofile, colorându-se optim la un pH în jurul lui 1.

§ 892. — Elementele ţesutului conjunctiv pot fi studiate pe ţesutul proaspăt, nefixat, fie prin disociere mecanică, fie cu ajutorul bulei de edem. In această ultimă eventualitate se injectează în derm câteva picături de soluţie salină fiziologică care disociază elementele conjunctive, permiţând studiul lor ulterior. Acesta se poate face prin examen direct cu ajutorul coloraţiilor cu roşu neutru sau albastru de metilen în soluţie salină fiziologică 1‰ (care poate constitui chiar lichidul de disociere), fie prin fixare după excizie şi colorare cu tehnicile adecvate.

§ 893. — Studiul elementelor ţesutului conjunctiv mai poate fi făcut şi după digerarea acestuia de către fermenţii proteolitici (pepsină, tripsină).

§ 894. — Digestia cu pepsină (0,1—0,5 g pepsină pulbere disolvată în 100 cc acid clorhidric 0,2%, la care se adaugă 2—3 cc toluen la 37—40°) topeşte fibrele colagene ale ţesutului conjunctiv, substanţa fundamentală fibrilară a cartilajului şi a osului, fibrilele de reticulină, substanţa cornoasă a unghiilor. Rămân intacte ţesutul elastic, nucleinele, neurokeratina, keratina din păr, chitina, lipidele şi glucidele.

§ 895. — Digestia cu tripsină (0,3 g tripsină pulbere în 100 cc de soluţie de CO_3NA_2 0,3% cu 2—3 cc toluen la 37—40°) topeşte ţesutul elastic, nucleinele, mucina, mucusul, condromucoidul, ca şi albuminele. Rămân intacte sau prea puţin alterate fibrele colagene ale conjunctivului, substanţa fundmanetală fibrilară a cartilajului şi osului, fibrilele de reticulină, keratina părului, chitina, lipidele şi glucidele.

§ 896. — Digestia se poate face pe fragmente de ţesuturi şi pe secţiuni, dar numai după îndepărtarea grăsimilor cu alcool fierbinte, acetonă, eter, cloroform, etc.

§ 897. — Digestia fragmentelor de ţesuturi se face după 1) fixare prealabilă în amestecul lui Carnoy (§ 248), apoi 2) fragmente de 3 mm grosime sunt trecute într'un aparat Soxleth, în care se face extragerea cu eter a grăsimilor timp de o săptămână; 3) piesele sunt trecute apoi prin alcooluri de concentraţie descrescândă până la apă; 4) spălate în apă 24 de ore şi 5) ţinute în soluţia de tripsină la 37° până când rămâne ţesut conjunctiv pur (circa o lună). Soluţia de tripsină trebue schimbată zilnic.

§ 898. — Digestia pe secţiune se face după tehnica următoare: 1) secţiunile pieselor fixate în alcool sau amestecuri cu sublimat se lipesc cu apă, *nu cu albumină glicerinată*, pe lame perfect degresate; 2) degresarea secţiunilor se face timp de 3—4 ore cu xilen şi apoi 6—7 zile în benzină; 3) de aci, prin alcool absolut, alcool 96% se trece în apă; 4) digestia este pregătită prin ţinerea timp de 24 de ore a secţiunilor în hidroxid de bariu (apă de barită); 5) spălare la apă curentă şi digerare în soluţia alcalină de tripsină (§ 895) la 37° timp de 6—24 de ore; (6 spălare în apă distilată şi 7) colorare în hematoxilină fosfotungstică (§ 900); 8) spălare, deshidratare, montare în balsam. Durata digestiei este variabilă, ea trebue să dureze până la eliberarea complectă a fibrelor conjunctive din complexul în care se găsesc.

§ 899. — Elementele celulare ale conjunctivului şi prelungirile lor citoplasmatice se pun în evidenţă pe fragmente mici de ţesut subcutanat disociate (§ 892), întinse pe lame şi fixate înainte de uscare în lichidul Maximov sau Helly. După spălare timp de 1—2 ore, trecere prin alcool şi apoi din nou în apă (alcoolul întăreşte şi mai bine structurile fixate), se colorează după metoda panoptică (§ 886).

COLORAREA SECŢIUNILOR DIN ŢESUTURI

§ 900. — Cea mai simplă metodă de colorare a ţesutului conjunctiv — ca şi altor componente tisulare — este utilizarea calităţilor deosebite ale *hematoxilinei fosfotungstice* (hematoxilină 1 g, soluţie apoasă de acid fosfotungstic 10% 20 cc, apă oxigenată 2 cc, apă distilată 800 cc. Disolvarea hematoxilinei se face la rece; soluţia poate fi întrebuinţată după 48 de ore şi se păstrează câteva luni).

1) Secţiunile la parafină făcute din piese fixate în Maximov, Helly sau Bouin sunt 2) oxidate câteva ore în soluţie iodo-iodurată, apoi 3) albite în tiosulfat de sodiu 5% şi spălate în apă; 4) secţiunile se ţin apoi în hematoxilină fosfotungstică 24 de ore la temperatura camerei sau 4 ore la 50°; 5) spălare cu apă distilată 5 minute, deshidratare, montare în *ulei de cedru*. Rezultate: cromatina apare colorată în albastru-închis, citoplasmele sunt albastre sau violacee, centrozomii albaştri ca oţelul, fibrina, fibroglia şi nevroglia în albastru aproape negru, cilindraxii sunt roz, colagenul roşu-purpuriu, iar mucusul portocaliu.

§ 901. — Picrofuxina (van Gieson) colorează în roşu după orice fixare fibrele colagene adulte din ţesuturi. Această colorare permite cel mai bine *studiul sclerozelor avansate*.

1) Secţiunile la ghiaţă, parafină sau celoidină, sunt colorate în prealabil cu hematoxilină, de preferinţă hematoxilină ferică Weigert timp de 10 minute; 2) după diferenţiere cu alcool clorhidric 0,5% şi 3) virarea

în apă litinată, 4) secțiunile se acoperă timp de 30—60 de secunde cu soluția de picrofuxină (soluție apoasă saturată de acid picric 90 cc, soluție de fuxină acidă 1% 10 cc). Durata colorării cu picrofuxină depinde de cantitatea de țesut conjunctiv, ea fiind cu atât mai scurtă cu cât acesta este în cantitate mai mare, fuxina având tendința să supracoloreze citoplasmele; 5) spălare în apă acidulată cu acid acetic 1/500, apoi în apă, deshidratare, montare în balsam sau balsam salicilic.

Nucleii apar colorați în albastru-violet, citoplasmele în galben, fibrele colagene în roșu. Coloranția nu se păstrează prea mult timp (6—12 luni) din cauza acidului picric care reduce fuxina la leucoderivat. Secțiunile colorate cu picrofuxină se pot fotografia fără dificultăți tehnice.

§ 902. — Coloranția cu roșu de tiazină este mult mai trainică decât cu picrofuxină. 1) Fixare practic indiferentă; 2) secțiunile deparafinate sunt colorate cu hematoxilină ferică (ca mai sus); diferențiere, virare și spălare; 3) secțiunile sunt ținute în picrotiazină până la colorarea puternică a colagenului în roșu (soluția colorantă se prepară din 200 cc apă distilată, 90 cc soluție apoasă 0,5% de roșu de tiazină, 10 cc soluție apoasă saturată de acid picric și 30 cc alcool 96%); 4) spălare rapidă în apă distilată; 5) eliminarea acidului picric în exces cu alcool 96%; 6) deshidratare, montare în balsam.

§ 903. — Azanul (*azo*carmin, albastru de *ani*lină) este una dintre modificările cele mai reușite ale vechii colorații a lui Mallory, utilizată astăzi din ce în ce mai puțin. Azanul reușește cel mai bine după fixări în amestecuri conținând sublimat sau acid picric. După fixare în formol, azanul reușește numai dacă fixarea a fost absolut corect făcută. Nu reușește colorarea preparatelor fixate în amestecuri cromate și insuficient spălate sau a celor supracromate.

1) Secțiunile deparafinate se trec din apă într'o soluție de azocarmin Gr (0,1 g azocarmin Gr se disolvă la fierbere rapidă în 100 cc apă; filtrare după răcire și adăugare de 1% acid acetic glacial). Colorarea se face într'un vas închis, timp de 45—60 de minute la termostat la 60°; 2) se lasă apoi vasul 5—10 minute la temperatura camerei să se răcească. (Dacă se încălzește înainte colorantul, timpul de colorare poate fi redus la 10—15 minute); 3) spălare în apă distilată; 4) diferențiere în alcool anilinat (aminobenzen 1 cc la 1000 cc alcool 90%), până când nucleii apar clar prin decolorarea restului țesuturilor; 5) spălare în alcool acetic 1%, timp de 30—60 de secunde; 6) mordansarea conjunctivului 1—3 ore cu acid fosfowolframic 5%; 7) spălare rapidă în apă distilată; 8) colorare în albastru de anilină + oranj 1—3 ore (în 100 cc H_2O se disolvă 0,5 albastru de anilină hidrosolubil și 2 g oranj G, se adaugă 8 cc acid acetic, se fierbe și se filtrează după răcire. La întrebuințare se diluează de două-trei ori); 9) spălare în apă, deshidratare, montare în balsam. Rezultate: fibrele precolagene și colagene sunt colorate în albastru, cromatina în roșu, mușchii în roșu-portocaliu, eritrocitele în roșu, fibrele gliale în roșu, mucusul în albastru. Granulațiile celulare

în galben, roșu sau albastru. Preparatul este durabil. Fotografiere numai cu filtru pentru albastru.

§ 904. — O metodă rapidă de colorare a fibrilelor fine este următoarea: 1) se colorează nucleii cu Kernechtrot 5 minute (0,1 g Kernechtrot se disolvă în 100 cc soluție apoasă caldă 5% de sulfat de aluminiu; filtrare după răcire); 2) spălare în apă distilată; 3) mordansare 5 minute în acid fosfomolibdic 1%; 4) spălare în apă distilată; 5) colorare 2 minute în albastrul de anilină Mallory (0,5 g albastru de anilină hidrosolubil, 2 g oranj G, acid oxalic 2 g, apă distilată 100 cc); 6) spălare în apă distilată, deshidratare, montare în balsam. Rezultatul coloranției este același ca în coloranția cu azan.

§ 905. — Tricromicul lui Masson este o coloranție excelentă a conjunctivului în ansamblul țesular, durează mult mai puțin decât azanul. Reușește bine mai ales după fixări în amestecuri cu sublimat, bicromat sau acid picric. După fixări în formol, fibrele conjunctive apar colorate grosolan. Dintre variantele tricromicului, cea mai reușită se execută după următoarea tehnică: 1) secțiunile deparafinate și trecute prin soluția iodo-iodurată și tiosulfat de sodiu sunt spălate abundent cu apă; apoi 2) sunt colorate 10 minute cu hematoxilină ferică Weigert; 3) spălare cu apă de robinet; 4) diferențiere în alcool clorhidric 0,5%; 5) spălare în apă; 6) virare în apă litinată; 7) secțiunile se acoperă apoi cu un amestec de ponceau R și fuxină acidă (ponceau R 2 g, fuxină acidă 1 g, acid acetic 4 cc, apă 300 cc, filtrare). Coloranția durează 10—15 minute, după care 8) secțiunile se spală bine cu apă; 9) se acoperă apoi timp de 3—4 minute cu acid fosfomolibdic 1%, după care 10) *fără spălare*, lamele se colorează cu albastru de anilină-oranj (albastru de anilină hidrosolubil 0,5 g, oranj G 2 g, acid acetic 2,5 cc, apă 100 cc, filtrare) timp de 1—2 minute (durata coloranției este invers proporțională cu cantitatea de conjunctiv); 11) spălare în apă; 12) diferențiere în apă acetifiată 1/500 3—5 minute; 13) deshidratare, montare în balsam.

Rezultate. Nucleii sunt roșii, nucleolii negri, citoplasmele roz-violacee, eritrocitele portocalii, conjunctivul albastru, mușchiul roșu, mucusul albastru-deschis, amiloidul violet-deschis. Fotografia este posibilă numai cu film colorat sau cu filtru corector pentru albastru.

Variante ale testului tricromic utilizează fie ponceau fără fuxină, fie fuxină fără ponceau sau, în fine, în ultimul timp, în loc de albastru de anilină-oranj se folosește verde lumină în soluție acetică (verde lumină 1 g, apă distilată 100 cc, acid acetic concentrat 1 cc). Niciuna din variante nu redă însă toată gama de culori a tricromicului original.

§ 906. — Fuxina bazică și picroindigocarminul realizează coloranții policrome recomandabile.

1) Secțiunile fixate în amestecuri neosmiate se colorează 10 minute la rece într'un amestec format din 1 parte soluție alcoolică saturată de fuxină bazică și 5 părți apă distilată; 2) după spălarea cu apă a colorantului, 3) se diferențiază cu apă acetificată 1/500; apoi 4) se co-

lorează 10 minute la rece într'o soluție proaspăt filtrată de indigocarmin (0,25 g indigocarmin în 100 cc soluție apoasă saturată de acid picric); 5) spălare cu apă distilată și în apă acetificată 1/500; 6) deshidratare și diferențiere în alcool absolut; 7) toluen, montare în balsam gros.

Dacă secțiunile sunt fixate în amestecuri conținând acid osmic, colorarea în fuxină se face la cald, la 50°, timp de 5 minute, iar supracolorarea durează numai 30 de secunde și se face cu o soluție mai concentrată, de 0,40 g indigocarmin la 100 cc acid picric.

§ 907. — Roschin folosește o tehnică puțin modificată: 1) el începe prin a colora cu picroindigocarminul (0,40 g %) timp de 10—20 de minute; se scurge colorantul, apoi 2) *fără spălare*, se acoperă lama cu soluția de fuxină bazică și se încălzește la flacără până apar vapori (nu la fierbere); secțiunile devin roșii; 3) diferențierea se face până la verde-palid cu alcool absolut; 4) montare.

Rezultate. Cromatina, cartilajul, mucusul se colorează în roșu-strălucitor, citoplasmele în verde-gălbui, mușchii în verde, țesutul elastic în roșu cărămiziu, colagenul în albastru-deschis.

IMPREGNAREA FIBRELOR ARGENTAFINE ȘI COLAGENE

§ 908. — Metodele de impregnație permit cel mai bine evidențierea fibrilelor argentafine de reticulină și a celor mai fine fibre colagene. In general, pe aceleași preparate, fibrele de reticulină apar negre sau brune foarte închis, în timp ce fibrele colagene sunt mult mai deschise la culoare, roșii-cărămizii, așa încât diferențierea între ele este totdeauna posibilă.

§ 919. — Metoda inițială a fost elaborată de Bielschowsky, toate celelalte metode fiind derivate. Cu toate îmbunătățirile aduse, substratul teoretic al acestor metode este încă insuficient cunoscut. Față de toate aceste îmbunătățiri vechea metodă originală și-a pierdut interesul într'atât încât ea nu mai este de utilitate practică. Noile metode, în special modificările aduse de Gömöri și Wilder, sunt mult mai practice, mult mai rapide (30 de minute în loc de 30 ore) dau rezultate excelente și sigure (metoda originală nu reușește decât pe o parte din secțiuni).

§ 910. — **Metoda Gömöri** dă rezultate bune pe țesuturi fixate în formol, amestecuri cu sublimat, bicromat sau acid picric, adică, în practică, în principalii fixatori universali. Includere în parafină. Secțiunile deparafinate sunt 1) oxidate timp de 1—2 minute cu hipermanganat de potasiu 0,5 — 1%; 2) spălare la apă curgătoare câteva minute și 3) albite 1 minut în metabisulfit de potasiu 1—3%; 4) spălare în apă de robinet 3—5 minute; 5) apoi secțiunile sunt sensibilizate 1 minut la acțiunea azotatului de argint, cu o soluție proaspătă 2% alaun de fier și amoniu (cristale violete); 6) spălare în apă curgătoare, clătire de două ori în apă distilată; 7) impregnare în soluție amoniacală de azotat de argint

1 minut (la 10 cc nitrat de argint 10 % se adaugă 2 cc hidroxid de potasiu 10 % și agitând se picură amoniac concentrat până când precipitatul brun se disolvă. Se adaugă în continuare cu picătura nitrat de argint 10 % până când precipitatul format se disolvă cu greutate. Se adaugă apă distilată până la volum dublu. Soluția se poate folosi numai 48 de ore dacă a fost păstrată la întuneric). După impregnare, 8) secțiunile se spală rapid în apă distilată; 9) reducerea se face timp de 5 minute în formol 1/10 diluat cu apă curgătoare; 10) spălare la apă curgătoare 5 minute; 11) virare în clorură de aur 0,1—0,2 % timp de 10 minute; 12) spălare în apă distilată; 13) reducere în metabisulfit de potasiu 1—3% 1 minut; 14) fixare în tiosulfat de sodiu 1% un minut; 15) spălare, deshidratare, montare în balsam.

Rezultate. Fibrele de reticulină apar negre, iar fibrele colagene roșii.

§ 911. — Elaborarea metodei Gömöri a scos în evidență importanța sensibilizării cu săruri, care dă rezultate mai bune decât cu tanin (vezi mai departe). Dintre 17 săruri metalice diferite, cele mai bune rezultate le dau sărurile de argint, aur, cadmiu, fier, plumb, zinc și uran, iar dintre acestea sărurile de fier.

§ 912. — Utilizarea apei curente apare în totală contradicție cu ceeace se întâmplă în celelalte metode de impregnare; totuși aspectele sunt perfect clare și lipsite de precipitate.

§ 913. — O altă caracteristică a reactivilor utilizați este și faptul că în metoda Gömöri soluția amoniacală de nitrat nu conține nitrat de argint ionizabil, ci aproape în totalitate fixat în sare complexă amoniacală, ceeace favorizează reducerea.

§ 914. — **Metoda Wilder** necesită reactivi ceva mai puțin curent întrebuințați, dar rezultatele sunt la înălțimea celor obținute după metoda Gömöri. Secțiunile sunt 1) oxidate un minut în hipermanganat de potasiu 0,25% sau în acid fosfomolibdic 10%; 2) spălare în apă distilată; 3) tratare cu acid bromhidric 34% diluat 1/4 cu apă distilată; 4) spălare la apă curentă și apoi distilată; 5) sensibilizare 5 secunde în nitrat de uran 1%; 6) spălare în apă distilată 10—20 de secunde; apoi 6) impregnare în soluția de hidroxiddiaminoargentic (în 5 cc dintr'o soluție 10,2% de nitrat de argint se picură amoniac concentrat, până când precipitatul format se redisolvă. Se adaugă apoi 5 cc dintr'o soluție 3,1% de hidrat de sodiu și noul precipitat se redisolvă cu amoniac, turnat cu picătura. Apoi diluare cu apă distilată la 50 cc); 7) spălare rapidă în alcool 96%; apoi 8) reducere un minut în: apă distilată 50 cc, formol 40% (neutralizat cu carbonat de magneziu) 0,5 cc, nitrat de uran 1% 1,5 cc; 9) spălare în apă distilată; 10) virare în clorură de aur 1/500 un minut; 11) spălare; 12) fixare în tiosulfat de sodiu 5% un minut; 13) spălare. Deshidratare, montare.

§ 915. — In cazul în care secțiunile au fost supraimpregnate, reducerea se poate face prin tratarea timp de 2—10 secunde cu o soluție de cianură de potasiu 0,5—1‰. Rezultate identice se pot obține cu o

soluție proaspătă 1—2,5 ‰ de hipermanganat de potasiu. Diferențierea trebue urmărită cu grijă pentru a nu decolora și fibrele impregnate.

§ 916. — In lipsă de clorură de aur, virarea impregnării argentice poate fi făcută și cu o soluție 1% de sulfit de sodiu.

§ 917. — Alături de sensibilizarea cu săruri metalice se utilizează destul de curent și sensibilizarea cu tanin. In acest grup intră metoda inițială a lui Achucarro și două modificări importante aduse de Del Rio y Hortega.

§ 918. — **Metoda Achucarro** inițială folosește piese fixate în formol 1/9 nu mai mult de un an, secționate la ghiață la 10—20μ și spălate apoi în apă distilată. Pot fi deasemenea utilizate secțiuni la parafină sau celoidină. In acest caz se folosește numai fixarea în amestecuri lipsite de săruri metalice.

1) Secțiunile se pun într'o soluție apoasă saturată de tanin și se încălzesc 15—30 de minute la 50°. După răcire, 2) fiecare secțiune se spală separat în apă distilată până când devine opacă. Apoi 3) secțiunile sunt trecute în 20 cc apă distilată în care s'au pus 8—12 picături de soluție argentoamoniacală Bielschowsky (într'un cilindru gradat cu dop șlefuit se pun 10 cc soluție NO_3Ag 10%, și 5 pic. NaOH 40%. Se picură apoi cu atenție amoniac concentrat până când din precipitatul brun nu mai rămân decât câteva granule. Diluare cu apă distilată până la 20 cc). Secțiunile se țin în această soluție până devin brune; 4) spălare rapidă în apă distilată; 5) reducere în formol 1/9; 6) spălare; 7) supracolorare eventuală cu eozină sau azur de metilen; 8) deshidratare, clarificare, montare în balsam.

§ 919. — Prima modificare a lui Del Rio y Hortega nu impregnează fibrele colagene și reticulinice, dar evidențiază nucleii, centrozomul, mitocondriile, granulațiile celulare, tonofibrilele, miofibrilele, incluziile celulare, glia, fibrina și fibrilele elastice. Fixarea indiferentă. Secțiuni la congelație. Din apă distilată 1) secțiunile sunt trecute într'o soluție apoasă de tanin 3%, 5 minute la 50°; 2) trecere în apă amoniacală 1/6 până ce devin transparente; 3) se pregătesc trei vase conținând 10 cc H_2O + 1 cc soluție argentoamoniacală (la 30 cc soluție NO_3Ag 10% se adaugă 40 picături soluție NaOH 40%. Precipitatul format este spălat de 10—12 ori cu apă distilată, utilizându-se 1—$1^1/_2$ l apă, apoi se suspendă precipitatul în 50 cc apă distilată și se picură amoniac până la disolvarea lui. Soluția se diluează la 150 cc și se păstrează timp îndelungat în sticlă brună). Secțiunile se pun în primul vas; când încep să se coloreze se trec în al doilea și, când se îngălbenesc, în al treilea, în care tonalitatea se închide și mai mult, ajungând până la culoarea tutunului; 4) spălare abundentă în apă distilată; 5) virare 20-30 de minute la 45° în clorură de aur 0,2%; 6) spălare în apă distilată; 7) fixare 1 minut în tiosulfat de sodiu 5%; 8) spălare abundentă. Deshidratare, clarificare, montare în balsam.

§ 920. — In cea de a doua modificare a lui Del Rio-Hortega se folosește o soluție alcoolică de tanin (în alcool 96%). Fixare în formol 1/10 sau în alcool, timp mai îndelungat. Secțiuni la congelare sau la celoidină. Secțiunile se trec din apă 1) în soluția alcoolică 1% de tanin pentru 5 minute la 55°; 2) după răcire, secțiunile se spală rapid în apă distilată, 3) după care se face impregnarea în trei vase ca mai sus (§ 919); 4) de aici piesele se trec în apă, unde sunt lăsate să stea la fund până se închid la culoare; 5) spălare rapidă în apă distilată; 6) reducere în formol neutru 20% 30 de secunde; 7) spălare rapidă în apă. Mai departe ca mai sus (§ 919).

COLORAREA FIBRELOR ELASTICE

§ 921. — Fibrele elastice pot fi puse în evidență prin unele din metodele de mai sus, dar mai ales cu ajutorul orceinei și al rezorcinfuxinei.

§ 922. — *Colorarea cu orceină* este posibilă după orice fixare. Secțiunile se trec din apă distilată 1) în colorant (1 g orceină, 100 cc alcool 70%, 1 cc acid clorhidric oficinal), unde se țin 30—60 de minute; 2) spălare rapidă în apă distilată și alcool 96%; 3) diferențiere în alcool absolut până rămân colorate numai fibrele elastice; 4) clarificare, montare în balsam.

Rezultate. Fibrele elastice apar net colorate în roșu-brun. După fixare în picroformolacetic (Bouin) se colorează și nucleii în violet.

Nucleii pot fi deasemenea colorați după ce s'a diferențiat țesutul elastic. Se folosesc de obicei hemalaunul, albastrul de toluidină, albastrul de metilen, albastrul policrom, etc.

§ 923. — **Metoda cu rezorcină-fuxină Weigert** dă rezultate și mai bune, evidențiind cele mai fine fibre elastice.

Colorantul se prepară astfel: soluția *A*: se disolvă 0,5 g fuxină bazică și 1 g rezorcină în 50 cc apă distilată la cald într'un Erlenmeyer de 200 cc. Soluția *B*: se disolvă deasemenea 2 g clorură ferică în 10 cc apă distilată. Se încălzește soluția *A* la fierbere și se toarnă apoi soluția *B* de clorură ferică. Se continuă fierberea încă 5 minute la flacără mică. După răcire la temperatura camerei, precipitatul format se culege pe un filtru mic. Precipitatul se poate usca și păstra ca atare, sau se disolvă imediat într'un flacon în 70—100 cc alcool 96°, încălzind încet până la fierbere. După răcire se adaugă 0,7 cc acid clorhidric concentrat (d = 1,19) și se filtrează.

§ 924. — Secțiunile se trec din apă 1) în alcool 80% și de acolo 2) în soluția de rezorcină-fuxină unde se țin 10—30 de minute; 3) spălare în apă curgătoare 1 minut, apa se scurge bine; 4) diferențiere în alcool 96% până când rămân colorate numai fibrele elastice. Deshidratare, clarificare (*fără fenol*), balsam. Nucleii pot fi colorați după diferențiere cu Kernechtrot, carmalaun, etc.

§ 925. — Coloraţia cu rezorcină-fuxină poate fi combinată cu o metodă pentru conjunctiv, de exemplu cu picrofuxină (Hornovsky) sau cu roşu de tiazină picricat. Coloraţia combinată se face astfel: 1) secţiunile se trec din alcool 80% în rezorcină-fuxină pentru 15 minute; 2) spălare în apă curgătoare şi apoi în apă distilată; 3) colorarea nucleilor cu hematoxilină ferică Weigert 3—5 minute; 4) spălare în apă distilată şi apoi în apă curgătoare 10 minute; 5) picrofuxină 30—60 de secunde sau roşu de tiazină picricat 5 minute (§ 902); 6) spălare rapidă în apă distilată; 7) diferenţierea fibrelor elastice şi în acelaş timp eliminarea surplusului de acid picric prin două tratări cu alcool 96%; 8) deshidratare, clarificare, montare în balsam.

§ 926. — O variantă a acestei colorații utilizează un timp comun de coloraţie cu rezorcină-fuxină şi hematoxilină. Se foloseşte un amestec preparat extemporaneu din trei soluţii: 5 cc dintr'o soluţie de hematoxilină 0,2 g, rezorcină-fuxină 0,05, alcool 70% 100 cc; 1 cc soluţie de clorură ferică oficinală (28,9%); 2 cc acid clorhidric concentrat. Coloraţia durează 10—15 minute.

COLORAREA AMILOIDULUI

§ 927. — Amiloidul, produs de alterare a substanţei fundamentale conjunctive, se colorează prin mai multe metode (tricromicul Masson îl colorează în violet-deschis). Colorarea amiloidului este împiedicată de acizii acetic şi fosforic în cazul reacţiei la iod, hidroxizii alcalini şi alcalino-pământoşi la reacţia la violet de metil. Cea mai bună fixare pentru amiloid se face cu alcool; curent se întrebuinţează însă formolul.

§ 928. — **Reacţia la iod** se execută pe secţiuni la congelare sau la parafină. Secţiunile se trec din apă 1) într'o soluţie iodo-iodurată foarte diluată, unde se ţin până devin galbene; 2) spălare în apă, includere în glicerină. Amiloidul se colorează în brun-roşcat.

§ 929. — **Colorarea cu violet de metil** (sau violet de genţiana): 1) secţiunile deparafinate se trec într'o soluţie 0,5% de violet de metil, pentru 5—10 minute (secţiunile la parafină pot fi colorate direct în soluţia de violet de metil încălzită la 40°, pe care se şi întind); 2) spălare în apă distilată şi diferenţiere 10—15 minute în acid acetic 1%; 3) spălarea acidului acetic cu apă; 4) fixare în alaun de potasiu 7%; 5 spălare, montare în gelatină boraxată sau sirop. Secţiunile nemontate se montează pe lame, se usucă la etuvă şi apoi se deparafinează în toluen şi se montează în balsam. Amiloidul apare colorat în roşu-violet, restul ţesuturilor în albastru.

§ 930. — **Colorarea cu roşu de Congo.** 1) secţiunile deparafinate se ţin într'o soluţie apoasă 1% de roşu de Congo 15—20 de minute (secţiunile la congelare numai 20 de secunde); 2) trecere 15 secunde printr'o soluţie apoasă saturată de carbonat de litiu; 3) diferenţiere

cu alcool 80%; 4) oprirea diferenţierii prin trecerea secţiunilor în apă. *Dacă coloraţia este slabă se poate repeta*; 5) spălare în apă 15 minute, eventual supracolorare cu hemalaun. Deshidratare, clarificare, montare în balsam. Amiloidul se colorează în roşu, hialinul şi coloidul rămân nenecolorate.

CARTILAJUL

§ 931. — Cartilajul poate fi colorat cu una din metodele obişnuite, mai cu seamă cu metoda Mallory sau una din derivatele sale, cu foarte bune rezultate. Celulele cartilajului pot fi cu uşurinţă recunoscute în massa substanţei fundamentale.

§ 932. — Pentru a colora selectiv *substanţa fundamnetală* şi a o ciferenţia de alte aspecte similare ale ţesuturilor vecine, cum este osul decalcificat, se întrebuinţează coloranţi, care prezintă fenomenul de metadromazie.

§ 933 — Aceşti colororanţi sunt destul de numeroşi, dar menţionăm în primul loc safranina (1%), care colorează substanţa fundamentală a cartilajului metacromatic în portocaliu, în timpul ce osul este colorat în roşul caracteristic safraninei. Roşul neutru (1%) colorează şi el metacromatic, substanţa fundamentală a cartilajului în galben, iar osul în roşu. Metodele de mai sus prezintă avantajul simplităţii.

§ 934 — Imagini mai contrastante dă următorul procedeu: 1) nucleii se colorează cu carmin litinat (2,5—5 g carmin se disolvă prin fierbere în soluţie saturată la rece cu carbonat de litiu; după răcire se filtrează); coloraţia durează 2—5 minute; 2) apoi se diferenţiază în alcool — acid clorhidric (0,5—1% HCl în alcool de 70%) timp de 15 minute până la câteva ore; 3) se spală în apă; 4) colorare într'o soluţie puternic diluată de albastru de metilen (cam 1 : 5 000), acidificată cu câte 20 picături de HCl 0,5 la fiecare 100 cc de sol. albastru de metilen de mai sus. Coloraţia se prelungeşte timp de 12—24 de ore; 5) se spală repede cu apă distilată şi se fixează colorantul cu molibdat de amoniu 5% timp de 2—3 ore; 6) se spală câteva minute în apă curgătoare şi se fac rapide treceri prin alcooluri, până la alcool de 96%; 7) colorare 1—3 minute în soluţie alcoolică de cromotrop 2R (soluţie concentrată în alcool de 96%; 8) alcool, xilen sau toluen; montare în balsam.

Rezultate. Cartilajul se colorează în albastru-strălucitor, nucleii violet până la roşu, colagenul şi fibrele musculare roz, ţesutul osteogen roşu-strălucitor.

§ 935. — **Fibrilele colagene** din interiorul cartilajului hialin nu pot fi puse în evidenţă direct, ele fiind mascate de substanţa fundamentală. Pentru a pune în evidenţă fibrilele, tratăm secţiunile cu apă baritată, apă de var sau mai bine o soluţie foarte diluată de hidroxid de potasiu, care hidrolizează condromucoidul substanţei fundamentale, izolând

fibrele. Acestea pot fi acum colorate cu amestecul fuxină acidă şi acid picric (amestecul lui Hansen: 100 cc sol. acid picric saturată + 5 cc sol. 2% fuxină acidă), sau oricare altă metodă de colorare a colagenului.

§ 936. — Reţeaua elastică a fibrocartilajului elastic trebue pusă în evidenţă prin metode specifice, cum ar fi rezorcinfuxina, sau mai bine orceina (§ 922).

§ 937. — Cartilajul calcificat trebue decalcificat înainte de includere şi sclecţionare după tehnici arătate la os.

Locurile decalcificate prind puternic hematoxilina (« urma calcară »). Această bazofilie nu este specifică numai cartilajului calcificat, ci o prezintă în acelaş timp şi conjunctivul calcificat.

OSUL

I. TEHNICA PREPARĂRII SECŢIUNILOR

§ 938. — Secţiunile pentru examen microscopic se pot obţine pe osul proaspăt fără nicio pregătire, cu ajutorul microtomului pentru secţionat metale. In general, grosimea secţiunilor astfel obţinută este mică, obişnuit folosindu-se secţiuni de 8 microni. Este un mijloc comod şi expeditiv, pe care-l recomandăm, acolo unde există aparatul. Secţiunile care se rulează sau se fărâmiţează trebue acoperite înainte de secţionare cu un strat subţire de celoidină.

§ 939. — O altă metodă constă în confecţionarea de plăci subţiri de os (în general nu sub 30 microni) prin şlefuire. Pentru şlefuire, secţionăm cu ferestrăul plăci osoase, a căror grosime să nu treacă de 1 mm. Dacă aceste plăci au întindere mai mare, putem porni la şlefuirea lor cu ajutorul unui deget (al indicelui) sau chiar a două degete (index şi medius). Dacă fragmentul obţinut este mic, îl vom monta pe lamă cu ajutorul sacâzului (colofoniului) topit. Această manevră se realizează uşor în felul următor: se încălzeşte lama pe platina încălzitoare până la topirea sacâzului; se lipeşte placa de os cu massa de sacâz topită şi se ridică lama de pe platina încălzitoare pentru a permite sacâzului să se solidifice. Şlefuirea osului începe aşa dar pe una din feţe, servindu-ne pentru început de o piatră litografică, iar mai apoi de o placă de sticlă foarte netedă pe care am presărat praf fin de carborund. La început se adaugă numai puţină apă la praful de carborund, dar, pe măsură ce progresează şlefuirea, pasta trebue să fie din ce în ce mai subţire. Osul montat pe lamă cu ajutorul sacâzului este mai uşor de manevrat dacă pe dosul lamei lipim un dop de plută cu ceară roşie şi manevrăm apoi lama cu ajutorul acestui dop. Operaţia de şlefuire pe prima faţă trebue

366

împinsă cât mai departe, pentru ca şlefuirea feţei opuse să nu mai ia timp mult (cel mult 5 minute). Dacă osul a fost lipit de lamă, el trebue mai întâi deslipit, pentru a-i şlefuim şi faţa dinspre lamă. Deslipirea este o operaţie delicată, fiindcă lama de os este acum cu mult mai subţire. Ea se poate realiza prin topirea sacâzului pe platina încălzitoare sau prin disolvarea lui în solvenţi organici (benzen, toluen). In cazul când avem de a face cu fragmente sfărâmicioase (de exemplu oase fosile), această operaţie trebue făcută cu cea mai mare precauţie. După o scurtă şlefuire pe cealaltă faţă, lama de os devine transparentă şi poate fi examinată la microscop. In general, este greu de obţinut lame de grosime uniformă prin şlefuire; la una din muchii lama de os va fi mai subţire.

§ 940. — In locul şlefuirii anevoioase pe amândouă feţele, putem şlefui numai pe o singură faţă, lăsând lama de os groasă, netransparentă. In acest caz examinăm osul în lumina reflectată, luminându-l de sus, şi nu de jos cu ajutorul condensatorului, ca în cazul şlefuirilor transparente.

§ 941. — **Decalcificarea** permite tratarea osului ca un ţesut moale; dintre mijloacele de decalcificare semnalăm ca fiind mai importante următoarele:

§ 941 a. — Acidul azotic fumans în diluţie de 5%. Această diluţie se prepară cu 7,5 cc de acitd azotic fumans (d = 1,40) şi apă distilată până la 100 cc. Decalcificarea durează până când constatăm că osul şi-a pierdut tăria şi e perfect flexibil. La nevoie (în cazul fragmentelor mari) se schimbă lichidul. Aceasta trebue făcută totdeauna când hârtia de turnesol nu virează prompt spre aciditate. După decalcificare în acid azotic introducem osul în soluţie 5% sulfat de sodiu, pentru a împiedica umflarea colagenului care are loc totdeauna când trecem preparatul din acidul azotic de-a-dreptul în apă. Numai după o şedere mai lungă în sulfat de sodiu putem trece la spălarea cu apă şi apoi la incluzie.

§ 942. — Acidul tricloracetic se întrebuinţează în soluţie apoasă de 5% sau, la fragmentele mai mari, chiar şi 10%. Criteriile de decalcificare sunt aceleaşi ca la procedeele anterioare. Din acidul tricloracetic, osul este trecut direct în alcool.

§ 942 a. — Acidul clorhidric cu amestec de sare (ClNa) nu este deloc recomandabil, pentrucă nu păstrează structurile celulare.

§ 943. — Un procedeu blând de decalcificare este tratarea cu citraţi, recomandată de autorii sovietici. Sabadaş (Doclad. 1950, LXX, 511) a găsit că citratul de amoniu este cel mai eficace în acest scop. Concentraţia necesară pentru fragmente mici de os este de 15% citrat de amoniu la pH =7—8, în care osul se menţine până ce lichidul nu mai dă reacţiile ionului Ca ++. Lichidul se schimbă de mai multe ori timp de 6 zile. Procedeul de mai sus este mai ales indicat în metodele histochimice.

§ 944. — **Cercetarea fosfatazelor.** In cazul când se cercetează fosfatazele, se vor pune fragmentele de os într'o cantitate mare dintr'un amestec de citrat de sodiu şi acid clorhidric, tamponat la pH = 4,5 după reţeta următoare: Sol. *A*. Se dislovă 21 g de acid citric în 200 cc soluţie normală de hidroxid de sodiu. Sol. *B* este soluţia n/10 de acid clorhidric. Se amestecă 30 cc *B* cu 70 cc *A* şi se adaugă 0,2 cc soluţie sulfat de zinc 1% cu o picătură de cloroform pentru a împiedica mucegaiul. Temperatura în timpul decalcificării trebue menţinută sub 10°, pentru a apăra fosfataza. Se decalcifică, schimbând mereu lichidul, până dispar ionii de Ca ++ din lichid (2—11 zile, după mărimea fragmentelor şi intensitatea calcificării). Trecând prin soluţia de decalcificat un curent de aer la trompa de vid, procesul decalcificării poate fi grăbit.

După un astfel de tratament enzima trebue totuşi reactivată cu tampon de veronal (veronal sodic 1% + 0,075% glicocol, la 37°, timp de 3—6 ore).

II. PUNEREA IN EVIDENŢĂ A CELULEI OSOASE

§ 945. — Cavitatea în care este aşezată celula osoasă cu prelungirile ei poate fi pusă în evidenţă pe şliful din osul macerat fără niciun fel de pregătire, decât actul macerăţiei. Recomandăm următoarea metodă rapidă de macerăţie a lamelor osoase subţiri, de preferinţă chiar a celor gata şlefuite: se prepară o soluţie de hidroxid de potasiu în glicerină după următoarea formulă: KOH 3 g, glicerină 100 cc. Intr'o eprubetă se introduc 15 cc din această soluţie şi se cufundă lamele osoase în ea. Se încălzeşte la fierbere (nu ţineţi eprubeta cu degetele, fiindcă punctul de fierbere al glicerinei este foarte ridicat!) timp de 3—5 minute. In timpul fierberii osul devine mai întâi gălbui, dar în cele din urmă îşi recapătă albeaţa. In acest moment, distrugerea substanţei organice e terminată. Se scurge lichidul alcalin şi se spală de câteva ori cu apă distilată. In ultima apă distilată se fierbe din nou osul. La sfârşitul acestei operaţii lama osoasă este încă suplă, avantaj însemnat pentru manipulările care urmează. Piesa astfel macerată este deshidratată, uscată şi montată în balsam topit, pentru ca aerul să rămână în interiorul cavităţilor osoase şi să le pună astfel în evidenţă. Examenul preparatului se face în condiţiile obişnuite.

§ 946. — **Celula osoasă** cu toate prelungirile ei mai poate fi pusă în evidenţă fără a macera osul şi fără a-l decalcifica; se recomandă următoarea metodă (*Ruppricht*) care dă rezultate absolut constante: 1) se prepară o soluţie concentrată de fuxină *bazică* în alcooluri de concentraţie crescândă: 60, 80 şi 100%; 2) fragmentele de os se introduc mai întâi în alcool de 60% şi se menţin acolo timp de 2—3 zile; 3) în fiecare din celelalte două soluţii se menţin câte 1—2 zile; 4) apoi se trec în xilen şi se fac şlifuri din ele, având grijă de a umezi osul mereu cu xilen;

5) după ce am atins grosimea convenabilă (30—50 μ), includem piesa în balsam gros. Celulele se colorează în roşu-închis împreună cu toate prelungirile lor, iar fondul se recolorează mai deschis şi transparent, reprezentând substanţa fundamentală a osului.

§ 947. — Pe osul decalcificat, celula osoasă cu toate prelungirile ei se poate pune în evidenţă după metodele generale. Dăm mai jos o tehnică (Schmorl, în modificarea Pechet), care reuşeşte totdeauna când coloranţii sunt proaspeţi: 1) fixare în Susa 6—12 ore; 2) se spală sublimatul cu ajutorul soluţiei iodo-iodurate, până la formarea pe suprafaţă a unui precipitat roşu, care se disolvă prin trecere în alcool de 80°. Se repetă operaţia până nu se mai formează precipitatul roşu de iodură de mercur. Rezultate foarte bune dă şi fixarea în amestecul Bouin; 3) decalcificare în acid tricloracetic 5%, apoi trecere în alcool, toluen, parafină; 4) includere şi facerea secţiunilor; 5) se colorează timp de 1—2 minute în colorantul care se prepară în modul următor: din soluţia saturată de tionină în alcool de 50% se iau 5 cc şi se adaugă 100 cc de apă distilată şi 5 picături de amoniac; 6) spălare în apă distilată; 7) cufundare în soluţia saturată de acid picric 30 — 60 de secunde; 8) spălare în apă distilată; 9) diferenţiere rapidă în alcool de 70% şi trecere rapidă prin celelalte alcooluri, până la xilen; 10) montare în balsam. Celula osoasă cu toate prelungirile ei se colorează clar în violet-închis pe fondul galben-deschis al substanţei fundamentale a osului.

§ 948. — In procedeul de mai sus tionina poate fi înlocuită prin albastru de toluidină în concentraţie de 0,25%. Se trece apoi în apă de fântână şi în apă distilată, înainte de a face cufundarea în acid picric. Dacă e nevoie, diferenţierea poate fi intensificată prin adăugare de acid acetic la alcool. Trecere rapidă prin alcooluri. Celula osoasă apare aproape neagră împreună cu toate prelungirile ei, pe fondul verde-deschis al substanţei fundamentale. Precipitatele microcristaline, care totuşi nu turbură claritatea imaginii, sunt greu, însă nu imposibil de evitat în această tehnică (Aburel).

§ 949. — Rezultate asemănătoare le obţinem după fixare în alcool de 95% şi decalcificare, apoi spălare în apă, includere şi debitare în secţiuni subţiri; colorare timp de 8—24 de ore în soluţie *foarte slabă* de violet de genţiană; şi aici trecerile prin alcool se fac repede, se ajunge la benzen şi apoi se montează în balsam de Canada. Celulele osoase şi prelungirile apar colorate în violet-închis pe fondul mult mai deschis, format de substanţa fundamentală.

§ 950. — **Osul decalcificat** poate fi tăiat la congelare sau — mai anevoios — inclus în celoidină sau un înlocuitor al acesteia şi debitat în secţiuni. Numai pe asemenea material se poate executa o variantă a metodei indicate la § 947 (*Schmorl B*). 1) Colorare în soluţie de tionină ca la § 947; 2) clătire cu apă, apoi alcool de 70%; 3) se clăteşte din nou scurt în apă distilată şi se introduce secţiunea în soluţia de 5% acid fosfotungstic 30—60 de secunde; 4) se spală în apă până când secţiunea

prezintă culoarea albastru-deschis; 5) se fixează culoarea prin cufundare în soluție de formalină 20% 1—2 ore, sau chiar și în soluție de amoniac (1 : 10) timp de numai 5 minute; 6) seria de alcooluri, benzen, montare în balsam.

Rezultatul este asemănător cu cel dela § 947.

III. PUNEREA IN EVIDENȚĂ A FIBREI COLAGENE IN SUBSTANȚA FUNDAMENTALĂ

§ 951. — Examenul în lumină polarizată ne dă informații asupra fibrei colagene din substanța fundamentală a osului. Intr'adevăr, această fibră posedă o birefringență pozitivă care poate fi ușor apreciată la microscopul cu polarizație și mai puternică decât birefringența negativă a cristalelor de fosfat ce intră în alcătuirea substanței fundamentale a osului. In felul acesta, fibra colagenă maschează prin dubla ei refringență pozitivă datorită formei, dubla refringență negativă a cristalelor de fosfat, care le este proprie.

§ 952. — Prin fierberea șlifului în glicerină alcalinizată, fibra colagenă este distrusă. Dacă acum montăm șliful în balsam (indice de refracție 1,6 sau aproape de acesta) apare birefringența negativă proprie cristalelor de fosfat. Trebue însă să avem grijă ca să nu rămână resturi de aer pe traiectele fostelor fibre colagene, care ar putea denatura rezultatul.

§ 953. — Birefringența pozitivă se stabilește cu ajutorul plăcuței de gips care dă între nicolii încrucișați un roșu de primul ordin. Pe direcțiile paralele cu prima linie mijlocie a plăcuței, însemnată pe plăcuța de gips, fibrilele vor apărea în culoare crescândă (adică albastră), iar pe direcția perpendiculară pe linia primă mijlocie, în culoare descrescândă (adică galbenă).

§ 954. — Examenul oaselor fosile. Oasele fosile, care au pierdut tot colagenul lor, se comportă în lumina polarizată ca și osul macerat prin fierbere în glicerină alcalinizată. Dar oasele fosile ale diluviului și-au păstrat în cea mai mare parte colagenul și se comportă în lumina polarizată principial la fel cu un os recent.

§ 955. — Pentru a pune în evidență prin colorație fibrilele din substanța fundamentală a osului, se poate întrebuința o metodă argentică, cum ar fi aceea a lui Bielschowsky. Metodele argentice dau însă rezultate nestatornice.

§ 956. — Tehnica argentică Macinschi este remarcabilă mai mult pentru simplitatea ei decât pentru constanța rezultatelor: 1) confecționarea șlifului, apoi spălare repetată în apă distilată și cufundare în soluția 1% NO_3Ag pentru 24 de ore la întuneric; 2) spălare rapidă și reducere în soluție de formalină 4% la temperatura camerei timp de 24 de ore. La suprafața șlifului se formează un precipitat gros; 3) îndepărtarea

precipitatului prin șlefuire în continuare pe amândouă fețele; 4) spălare cu apă și cufundare în soluția 1% tiosulfat de sodiu timp de 6 ore; 5) spălare în apă distilată timp de 12 ore, cu schimbare frecventă a apei; 6) alcool, xilen, montare în balsam.

Fibrilele apar negre pe fondul cenușiu al preparatului.

§ 957. — Pe osul fixat în lichidul Helly și decalcificat în NO_3H 5%, inclus apoi în parafină și debitat în secțiuni, se poate întrebuința cu rezultate constante formula Weigert: 1) secțiunile se trec timp de 5—10 minute în soluția violet de gențiană 1% în apă anilinată; 2) fixarea în soluția Lugol timp de 5—10 minute; 3) diferențiere într'un amestec de 1 parte ulei de anilină plus 3 părți xilen; 4) xilen și montare în balsam.

Fibrilele apar întunecoase pe fondul complect decolorat al substanței fundamentale.

DINȚII

§ 958. — Dinții pot fi pregătiți pentru examenul microscopic fie prin șlefuire, fie prin decalcificare și incluzionare întocmai ca și osul.

§ 959. — Pentru șlefuire, dinții uscați și degresați vor fi secționați cu ajutorul unui ferestrău circular cu lamă de oțel, căci secțiunea cu ferestrăul obișnuit ar răpi prea mult timp. Discul mai gros obținut se șlefuește după tehnica indicată la os.

§ 960. — Decalcificarea. *Pentru decalcifiere nu vom întrebuința decât dinți proaspeți.* In asemenea condiții obținem rezultate bune, chiar dacă substanțele minerale sunt atacate direct de către acizi. Pentru a păstra însă mai bine suportul proteic al substanțelor minerale, includem mai întâi dintele în celoidină, după tehnica obișnuită, și numai după această operație îl decalcificăm.

§ 961. — După decalcificare, dintele se include de preferință în celoidină (dacă nu era inclus deja la decalcificare), sau cu o metodă mixtă celoidină-parafină (§ 449).

§ 962. — Secțiunile pot fi colorate cu metodele curent de colorație. Dacă e vorba să contrastăm diversele componente, colorația (§ 903) Azan-Heidenhain dă foarte bune rezultate, emailul apărând în albastru, iar dentina în roșu.

§ 963. — Lumina polarizată poate fi întrebuințată cu raze X întocmai ca și interferometria pentru a studia dispoziția cristalelor de apatită în interiorul prismei adamantine.

§ 964. — Pulpa dentară poate fi studiată aparte, după ce se zdrobește cu precauție dintele într'o menghină. Se îndepărtează fragmentele de email și dentină, iar pulpa se culege în soluție salină fiziologică. Prin dilacerare cu instrumente fine se pot obține mici fragmente de țesut în care odontoblastele pot fi ușor recunoscute, după lungimea prelungirilor lor.

ȚESUTUL MUSCULAR

MUȘCHII STRIAȚI

§ 965. — Recoltarea materialului trebue făcută cât mai rapid, pentru a se evita diverse artefacte.

Pentru o bună *fixare* se recomandă ca fragmentul de mușchi să fie învelit în tifon, ținut 1—3 ore într'un cristalizor larg în soluție salină fiziologică. După aceasta se va întinde pe plută cu ace de arici sau de sticlă, continuându-se fixarea tot în cristalizor, cu o cantitate abundentă de fixator.

§ 966. — **Fixatorii** întrebuințați sunt: 1) formolul 10—15% (1:4); 2) sol. 5% acid tricloracetic timp de 3—24 de ore, după care (fără spălare în apă) se trece în alcool 96°; 3) amestecul « Susa » — acelaș timp (§ 243); 4) sol. saturată apoasă de sublimat 25 cc. Acid tricloracetic 5% 20 cc. Formol conc. 5 cc. Timp de 1—12 ore, apoi în alcool 80—95°; 5) sol. clorură de platină 1%, fragmente foarte mici.

§ 967. — **Includerea** se poate face prin toate metodele obișnuite. Se recomandă secțiuni la congelație, directe sau după includere în gelatină (pentru studiul structurilor înainte de retracția fragmentului la termostat) și colorații pentru grăsimi neutre.

Deasemenea se recomandă colorația pentru glicogen, după fixarea adecvată.

§ 968. — **Coloraţiile obișnuite**: hematoxilină-eozină, picrofuxină, tricrom Masson, etc., dau rezultate satisfăcătoare pentru evidențierea diverselor leziuni musculare. Prin colorația cu picrofuxină (§ 901) se evidențiază foarte mult țesutul muscular (colorat în galben) față de țesutul conjunctiv care apare colorat în roșu.

Colorații speciale. Se folosesc mai des:

§ 969. — *Azan (Heidenhain)*, în care țesutul conjunctiv și reticular apare colorat în albastru; țesutul muscular în roșu-portocaliu; nucleii în roșu; eritrocitele în portocaliu; mucusul și amiloidul în albastru.

§ 970. — **Alaunul de fier+hematoxilina** (Heidenhain) (§ 619) dă următoarele rezultate: structurile nucleare în negru-albăstrui foarte clar; protoplasma celulelor colorată slab în cenușiu; țesutul conjunctiv rămâne necolorat; striațiile musculare se colorează în negru-albăstrui foarte net.

§ 971. — Rezultate frumoase dă și metoda Schmidtmann: 1) secțiuni foarte subțiri la parafină sau celoidină; 2) colorare 1/2—1 oră în soluție concentrată de roșu neutru în apă; 3) spălare în apă distilată; 4) colorare timp de 1 minut într'o soluție apoasă concentrată de acid picric; 5) deshidratare în alcooluri; xilen; balsam.

Rezultate. Substanța anizotropă se colorează în roșu-cafeniu; substanța izotropă în galben.

MUȘCHII NETEZI

§ 972. — Fixarea se face ca și la mușchii striați.

§ 973. — **Coloraţiile** obișnuite ne dau rezultate satisfăcătoare, în special metoda cu picrofuxină prin care fibrele musculare se colorează în galben.

§ 974. — **Coloraţii speciale**: 1) Azan; 2) tricrom Masson; 3) impregnări argentice după metoda Bielschowsky, Gömöri, etc., care diferențiază fibrele musculare de cele conjunctive și reticulare.

§ 975. — **Coloraţia Neubert-Petersen**: 1) secțiunile din apă distilată se trec în 2) colorantul care se prepară astfel: albastru acid de alizarină 0,5 g, sulfat de aluminiu (chimic pur) 10 g, apă distilată 100 cc. Se fierbe amestecul 5—10 minute; după răcire se readuce soluția la 100 cc, complectându-se cu apă distilată și se filtrează. Soluția caldă este albastră-închis; după răcire devine roșie-violetă. In acest colorant lamele se țin 5—30 de minute. Diferențiere 20—30 de minute în sol. 5% acid fosfowolframic; 4) spălare în apă distilată, schimbată de mai multe ori; 5) spălare în apă de izvor 5—15 minute; 6) deshidratare în alcooluri; xilen, balsam.

Rezultate. Țesutul muscular se colorează în albastru-închis; nucleii în albastru-deschis.

MIOCARDUL

§ 976. — **Fixarea** se face în mod obișnuit prin: formol, Helly, Zenker, amestecuri cu sublimat, Bouin și fixatori pentru glicogen.

§ 977. — **Includerile** se fac după metodele obișnuite.

Totdeauna să se facă secțiuni la congelație și coloraţie pentru grăsimi cu Sudan III și Scharlach R. Să se caute totdeauna și glicogenul.

Coloraţiile obișnuite dau rezultate destul de bune.

§ 978. — **Coloraţii speciale:** a se vedea dela mușchii striați și netezi. In afară de acestea se poate face curent metoda Heidenhain: fixarea în soluție de sublimat, includere la parafină, secțiuni foarte subțiri (3 -4 μ), scoaterea sublimatului din secțiuni cu lugol și tiosulfat de sodiu. 1) Secțiunile din apă distilată se trec la 2) colorare timp de 1-- 5 minute în soluție 1% de negru briliant 3 B acetificat; 3) spălare scurtă în apă distilată; 4) colorare 5—10 minute în albastru de toluidină 1%; 5) uscare cu hârtie de filtru netedă; 6) diferențiere în alcool absolut. Dacă diferențierea merge încet, se poate grăbi cu alcool metilic sau amestec de alcool etilic și metilic în părți egale; 7) xilen; balsam.

Rezultate. Striațiile transversale ale miocardului se colorează în albastru-deschis, iar segmentul intermediar în albastru-închis.

VASELE

§ 979. — Atunci când sunt de calibru mic, studiul vaselor se face odată cu ţesuturile în care se găsesc. Vasele de calibru mijlociu şi mare se pot izola şi fixa în formol, Susa, Müller, etc.

Când este vorba de un fragment de aortă cu zone calcificate, se face mai întâi decalcificarea cu metodele obişnuite sau prin fixarea în soluţie 5% de acid tricloracetic. Includerea în gelatină dă rezultate foarte bune, în special pentru aterom. Pentru conservarea tuturor elementelor şi continuitatea structurilor, vasele trebue incluse în celoidină.

§ 980. — **Coloraţiile obişnuite** ne dau rezultate satisfăcătoare.

§ 981. — Pentru punerea în evidenţă a *fibrelor elastice* şi a limitantelor elastice din aortă şi vase, se folosesc următoarele metode: orceină (§ 922), rezorcină-fuxină (§ 923), Hornovschi (§ 925). Coloraţia Hornovschi dă rezultate foarte frumoase.

PARENCHIMELE

APARATUL RESPIRATOR

TRAHEEA

§ 982. — **Fixare.** De preferat în Bouin, Susa, Zenker.

§ 983. — **Includere.** Din cauza straturilor de diverse consistenţe se preferă de obicei celoidina.

§ 984. — **Colorare** cu hematoxilină-eozină, Azan, mucicarmin.

PLĂMÂNUL

§ 985. — **Fixare.** Pentru o bună fixare a plămânului se întrebuinţează un procedeu mai puţin obişnuit în tehnica curentă: e vorba de injecţia intravasculară de fixator. Această metodă se aplică însă doar la studiul animalelor de experienţă. După sacrificarea animalului se spală întreg plâmânul, injectând intravascular soluţie clorurată izotonică călduţă pentru a spăla sângele. Se injectează apoi o cantitate de fixator Susa, această operaţie făcându-se bine cu un aparat cu presiune. Se cufundă apoi întreg organul în fixator Susa. După fixare se prelevează o piesă bine orientată, de preferat perpendiculară pe suprafaţa organului. Pentru piesele recoltate la necropsie se procedează în acelaş fel, înainte de a fi secţionate.

§ 986. — **Includere** în parafină.

§ 987. — **Colorare.** Invelişul alveolar este bine evidenţiat cu metodele Azan şi Masson. Fibrele elastice şi reticulare se colorează cu orceină sau metoda de impregnare argentică.

§ 988. — Pentru impregnarea învelişului alveolar se recomandă următoarea metodă: cu o seringă de sticlă de injectează în trahee soluţie de nitrat de argint 0,5% încălzită în prealabil la 37°. Se repetă această operaţie de câteva ori, aspirând şi înlocuind soluţia. Se ţine apoi întreg organul în nitrat de argint încă 6 ore la întuneric. Se taie apoi în bucăţi mici care se mai lasă 6—12 ore în NO_3Ag. Se spală cu apă distilată, se taie secţiuni de 60 microni, la ghiaţă, care apoi se pun la soare sau la o lumină tare. In loc de apă se pot pune secţiunile într'o soluţie de hidrochinonă 2% cu 0,5% formol. Când secţiunile au devenit brune se spală şi se virează în clorură de aur.

Inainte de reducere se pot eventual include în parafină; secţiunile se lipesc cu apă, se deparafinează, apoi se reduc şi se colorează nucleii cu azocarmin (ca la Azan). Se poate colora totodată şi cu orceină.

TUBUL DIGESTIV ŞI GLANDELE ANEXE

GLANDELE SALIVARE

§ 989. — **Fixare.** Se recomandă în special fixarea în Regaud sau Champy. Includere la parafină. Colorare cu hematoxilină ferică sau cu metoda Altmann-Bensley, în care caz mucina apare albastră-verde, permucina = roşie.

Observaţie : pentru a obţine glande salivare în activitate se injectează la iepure subcutanat 1—3 cc soluţie 1% de pilocarpină.

§ 990. — **Metoda pentru granulele celulelor secretoare.** 1) Fixare 24 de ore în soluţie acid osmic 5% în soluţie NaCl 3% 3 cc, sol. sat. bicromat de potasiu 1 cc; 2) spălare 2—4 ore în sol. 2% NaCl; 3) alcool 70° schimbat des în 3—4 ore; 4) alcool absolut 1 oră. (*Observaţie*: în niciun caz trecerile prin alcooluri nu vor depăşi 5 ore în total, pentru a nu se întări piesa); 5) includere, secţiuni; 6) mordansare 45' în alaun de fier 3—4%; 7) spălare în apă distilată; 8) colorare 10—20' în soluţia de toluidină 1%; 9) diferenţiere în alcool 50° până nu mai ies nori de culoare; 10) montare.

STOMACUL

§ 991. — **Fixare** în alcool-formol, sublimat, Zenker.

§ 992. — **Includere**: se recomandă includerea la parafină cu condiţia expresă ca eliminarea alcoolului absolut să se facă prin *benzen* sau benzoat de metil, nu cu xilen, care întăreşte musculoasa mucoasei, fapt ce face imposibilă secţionarea în întregime a piesei.

§ 993. — Pentru colorare, în afara metodelor uzuale se recomandă cele de mai jos.

§ 994. — Metoda pentru celulele mucoasei (Bensley).

1) Fixare 30 de minute — 2 ore la întuneric în fixatorul format din bicromat de potasiu 3% şi sol. sat. sublimat în alcool absolut în părţi egale; 2) trecere în alcooluri, incluzie, secţiuni; 3) colorare 1 minut în amestec în părţi egale a două soluţii saturate de oranj G şi fuxină acidă; 4) spălare în apă; 5) colorare 1 minut în sol. saturată apoasă de toluidină; 6) spălare în apă; 7) alcool absolut-xilen-balsam.

Rezultate. Mucusul roşu metacromatic; zimogenul şi prozimogenul albastre; granulele celulelor parietale roşii.

§ 995. —Metoda pentru mucoasa stomacală (Zimmermann).

După deparafinare 1) colorare puternică cu hemalaun; 2) diferenţiere în alcool clorhidric până ce conjunctivul apare incolor; 3) colorare în mucicarmin 24 de ore; 4) colorare rapidă în Auranţia (sol. apoasă saturată); 5) diferenţiere scurtă în alcool 50°; 6) alcool absolut, xilen-balsam.

Rezultate. Celulele epiteliului superficial roşii; celulele principale albastre-cenuşii; celulele secundare galbene.

§ 996. — O altă metodă bună este următoarea: 1) bucăţi mici de mucoasă se fixează 24 de ore în amestecul: formol 33 cc, alcool 80° 66 cc, acetat de potasiu 3—6 g; 2) deshidratare, includere, secţiuni; 3) colorarea nucleilor cu carmin; 4) colorarea 12 ore în sol. violet de metil (diluată); 5) diferenţiere în alcool absolut 1 minut; 6) xilen-balsam.

Rezultate. Nucleii apar roşii; granulaţiile celulelor principale apar violete.

§ 997. — Metoda cu hemalaun-roşu Congo. *Tehnica.* 1) Fixare în Carnoy, alcool-formol, amestecuri cu sublimat, includere la parafină, secţiuni; 2) colorare în hemalaun, virare; 3) colorare 2 minute sau mai mult în sol. apoasă 0,03% de roşu de Congo; 4) diferenţiere în apă distilată sau alcool 50°; 5) alcool absolut-xilen-balsam.

Rezultate. Celulele principale apar albăstrui, cele marginale roşii-brune.

Observaţie. Preparatele colorate cu roşu de Congo nu trebue să vină în contact cu acizi care virează culoarea în albastru.

§ 998. — Metoda pentru canaliculele intracelulare din celulele secundare. 1) Fixarea în bicromat de potasiu 2,5% 40 cc, acid osmic 1% 10 cc pentru piesele mici (2—3 mm grosime, 5—10 mm^2 suprafaţă) la 20°. Aproximativ 5—6 bucăţi pentru 50 cc fixator. Durata 2—7 zile; 2) uscare cu hârtie de filtru şi trecere în câteva porţiuni de NO_3Ag 0,75% până nu mai apar precipitate, apoi 1—2 zile în NO_3Ag 0,75% la întuneric şi 20—35° (maximum!); 3) spălare 1—2 ore în alcool 40°; 4) alcool absolut 12 ore. Alcool-eter 24 de ore. Celoidină 4% 1—2 zile. Apoi se pune pe un bloc de lemn, se toarnă celoidină 8%, se ţine la aer şi apoi în alcool 70° până se poate tăia; 5) secţionare,

spălare în alcool 90° pentru a evita ca secţiunea să se întunece; 6) trecere 10—15 minute în soluţie clorurată izotonică 100 cc, alcool 96° 200 cc; 7) se lasă apoi aproximativ 12 ore la lumină în alcool 75°; aci cromatul de argint se transformă în clorură; 8) supracolorare cu tionină sau safranină.

§ 999. — Metoda pentru celulele argentafine (Masson). 1) Secţiuni la ghiaţă din material formolat se spală 2—3 ore în apă cu 10 picături amoniac la 1000 cc, pentru a elimina formolul şi clorurile; 2) trecere în vas închis în *lichid Fontana 36—48 de ore* (sol. 5% NO_3Ag, se picură amoniac până ce precipitatul format la început se redisolvă, la care apoi se adaugă NO_3Ag până la opalescenţă permanentă); 3) apă distilată; 4) aurire în *sol. Cajal*: aproximativ 10 minute; 5) trecere într'un amestec în părţi egale din sol. *A.* sulfocianat de amoniu 2% 3 cc, tiosulfat de sodiu ($S_2O_3N_2$) 3 g, apă distilată 100 cc, sol. *B.* clorură de aur 1%; trecere în tiosulfat de sodiu 5% aproximativ 1 minut.

§ 1000. — O altă metodă bună pentru celule argentafine este următoarea: 1) fixare în formol neutru 1/9; 2) secţiuni la celoidină sau parafină; 3) colorare 24 de ore în hematoxilină (1 g hematoxilină la 100 cc alcool 70° diluată o pic. la 100 cc apă). Ac. molibdenic în exces. Dacă după 24 de ore colorarea e insuficientă se mai adaugă 1 picătură soluţie-mamă; 4) apă distilată, apă de robinet, alcooluri, xilol.

Rezultate. Nucleii apar albaştri, granulaţiile celulelor argentafine negre-brune sau negre-verzui.

INTESTINUL

§ 1001. — *Celulele mucoase* se pun în evidenţă astfel: fixare în alcool-formol, bicromat-formol. Includere în parafină. Colorare în mucicarmin, mucihemateină, tionină, toluidină, hematoxilină Delafield + safranină picrică.

§ 1002. — *Celulele Paneth* din colon şi rect se pun în evidenţă astfel: fixare în Regaud, includere în parafină; colorare cu tricromul Bensley (§ 1034) sau genţiana neutră (vezi pancreas).

§ 1003. — *Glandele Brünner* se evidenţiază astfel: fixare în formol-alcool, colorare în carmin Best, amestec de eozină-indulină auranţia care le colorează în albastru-verde.

§ 1004. — Plăcile Peyer. Se caută microscopic, se fixează în Helly sau Maximov, se colorază cu metode hematologice (Maximov, Giemsa).

§ 1004 a. — Plexurile nervoase se evidenţiează cu metodele Boecke, Bielschowsky-Gros, etc. (vezi acolo). Este recomandabil pentru intestin deasemenea.

§ 1005. —Tripla coloraţie hematoxilină-safranină-acid picric necesită: 1) sol. hematoxilină Delafield, 2) sol. safranină 0,2 g la 60 cc alcool 50°, 3) sol. acid picric 1 g la 15 cc alcool absolut. Pentru întrebuinţare

se iau 5 picături soluție-mamă la 5 cc alcool absolut. *Tehnica.* 1) Fixare în Zenker, sau cromo-aceto-osmic, includere la parafină, secțiuni; 2) colorare 2—3 ore în 3 picături sol. filtrată de hematoxilină Delafield la 25 cc apă distilată; 3) spălare în apă distilată 1 minut; 4) colorare 5 minute în sol. safranină (0,3 g % în alcool 50°); 5) trecere în trei alcooluri absolute câte 5 minute; 6) trecere în sol. diluată acid picric 1 minut (5 pic. sol. saturată în 5 cc alcool absolut). Alcool absolut 30 de secunde, uscare, xilen, balsam.

Rezultate. Nucleii apar roșii, citoplasma galbenă, mucusul albastru.

FICATUL

§ 1006. — Pentru studiul arhitectonicii lobului hepatic se recomandă studiul ficatului de porc. Pentru studiul hematopoezei hepatice la om, maximul de desvoltare e în luna a V-a. La puiul de găină sunt două perioade: între ziua 7—9 și ziua 11—14.

Fixare în Bouin, Helly, Susa. Pentru studiul grăsimilor, formol; pentru glicogen alcool; pentru condriom Regaud. Pentru *vezicula biliară* se recomandă injectarea de fixator Carnoy.

Includere la parafină.

Colorare cu diverse metode.

§ 1006 a. — Metoda pentru evidențierea citologică a formării bilei. 1) Fixare 12 ore în sol. $BaCl_2$ 3% (piese de 3—4 mm); 2) suprafixare 12—18 ore în formol; 3) deshidratare — includere la parafină, secțiuni de 5 μ; 4) colorare 1—3 minute în fuxină acidă 0,1%; 5) spălare cu apă distilată; 6) acid fosfomolibdic 1% 30 sec.—1 minut și apoi fără spălare în amestecul albastru de anilină 0,5 g, oranj G 2 g, acid oxalic 2 g, apă 100 cc 3—5 minute; 7) apă distilată, alcooluri, xilen, balsam.

Rezultate. Conținutul capilarelor biliare și o parte a granulelor din celulele hepatice apar colorate în roșu-intens, nucleii în albastru sau oranj, celulele Kupffer, epiteliile căilor biliare, țesutul conjunctiv — albastru. Eritrocitele în portocaliu.

§ 1007. — Metoda pentru canaliculele biliare. *Tehnica:* 1) fixare în formol 10% 5—10 zile. Spălare în apă distilată; 2) trecere în mordant Weigert aproximativ 10 zile (mordant vechi de cel puțin 10 zile preparat din fluorură de crom 2,5 g, acid acetic 5 g, acetat de cupru 5 g, apă dist. 100 cc, formol 10 cc); 3) spălare în apă dist. Includere la celoidină; 4) secțiuni de 3—5 μ se colorează în hematoxilină 24 de ore, dacă soluția e proaspătă, 15 minute dacă e veche; 5) trecere 5 minute în soluție saturată de acetat de cupru diluată la 50% cu apă dist.; 6) diferențiere în diferențiator Weigert diluat 1/2—1/9 până la culoare galbenă-cenușie (control microscopic); 7) trecere în carmin litinat 5% câteva minute până se decolorează celoidina; 8) spălare în apă distilată, deshidratare, clarificare în ulei de Origan, balsam.

Rezultate. Canaliculele biliare au pereții negri sau albaștri-închis; celulele hepatice sunt albastre-deschis, fibrele conjunctive roșii.

§ 1008. — O altă metodă pentru capilarele biliare este următoarea: 1) fixare cel puțin 20 de zile în formol 10%; 2) secțiuni subțiri la ghiață; 3) se încălzesc și se răcesc 20 de minute secțiunile într'o baie de NO_3Ag până se fac brune-aurii. Baia se prepară astfel: 30 cc NO_3Ag 10% se precipită cu 30 cc sol. saturată apoasă de carbonat de litiu. Precipitatul se spală de câteva ori cu apă distilată. Se adaugă 100 cc apă distilată și se disolvă aproximativ 1/2—3/4 din precipitat picurând câte puțin amoniac concentrat. Se filtrează într'o sticlă brună. Soluția ține cam 2 săptămâni. 5 cc din această soluție de carbonat de Ag se diluează în 5 cc apă dist. și se adaugă 2—3 cc piridină. *A nu se încălzi decât până iese abur*; 4) reducere în formol 20% 1 minut; 5) fixarea impregnației în tiosulfat de sodiu 2% 1 minut; 6) spălare în apă cu formol neutru aproximativ 2—3 zile; 7) alcool 90°, xilen fenolat, xilen, balsam.

RINICHIUL

§ 1009. — **Fixare** în Susa, Helly, formol-alcool, Dubosq-Brazil.

§ 1010. — **Includere** în parafină.

§ 1011. — **Colorare.** Pentru epicitele glomerulare se preferă colorarea în hematoxilină ferică bine diferențiată, urmată de colorare de contrast cu tricrom Masson.

§ 1012. — Pentru colorarea platoului striat, fixare în Carnoy, colorare cu hematoxilină ferică, urmată de o soluție foarte slabă de fuxină acidă în alcool 90°.

§ 1013. — Conjunctivul se colorează cu Azan sau Masson. Reticulina cu metoda Bielschowsky, Wilder, Gömöri.

§ 1014. — Colorarea pe secțiuni a cristalelor de acid uric sau a infarctelor urice se face după Schultz (vezi Histochimia). Se pot colora deasemenea cristalele de urat de sodiu.

GLANDELE CU SECREȚIE INTERNĂ

HIPOFIZA

§ 1015. — **Fixare** în amestecul Susa, Zenker-formol, Bouin, pentru metodele speciale în Regaud sau amestecuri osmice.

§ 1016. — **Includere**: Se recomandă o includere îngrijită la parafină, care să permită obținerea cu ușurință a unor secțiuni subțiri și bine întinse.

§ 1017. — Metoda generală pentru lobul anterior al hipofizei este următoarea: 1) fixare în Maximov sau Helly; 2) colorare în amestec

în părți egale de soluție apoasă de eozină 0,5% și soluție apoasă de albastru pirol izamină 0,3% timp de 30—35 de minute la 50°; 3) spălare rapidă în apă distilată; 4) diferențiere în amestecul: soluție carbonat de sodiu 5% 10 părți și alcool absolut 40 părți (control la microscop); 5) alcool de concentrație crescândă, xilen, balsam.

§ 1018. — *Rezultate.* Celulele acidofile sunt colorate în roșu, celulele bazofile sunt colorate în albastru-închis, celulele cromofobe sunt albastre-deschis.

§ 1019. — O metodă recomandabilă pentru celulele lobului anterior al hipofizei este următoarea (crezazan): 1) fixare în Susa, sublimat-acetic, formol; 2) includere prin benzoat de metil-celoidină, parafină sau după trecere prin alcool-eter în celoidină-parafină; 3) secțiuni de circa 5 μ se trec în alcool iodat pentru eliminarea precipitatelor de sublimat, apoi în tiosulfat 5% pentru a le albi, după care se spală abundent în apă distilată. Se trec apoi în alcool 80°; 4) *colorare în crezofuxină* (se disolvă la cald 0,2 g rezorcin-fuxină în 100 cc alcool 80°, apoi se adaugă 2 cc HCl oficinal, filtrare) între 1 oră și 48 ore, depinzând de fixare și vechimea soluției colorante. Pentru control se spală repede secțiunile în alcool de 96° și se examinează la microscop; celulele β trebue să fie albastre negre sau brune; 5) diferențiere în alcool de 96° schimbat de trei ori. Ultimul alcool durează 15 minute. Fondul se decolorează și rămân colorate clar celulele β; 6) trecere 15 minute în alcool-anilină 0,1‰ care mordansează colorarea nucleilor; 7) colorare în soluția apoasă de azocarmin 0,25—1% acidulată 1% cu acid acetic (care a fost în prealabil încălzită într'un pahar la etuva de 56°) timp de 10 minute, apoi se scoate paharul cu totul și se lasă să se răcească; 8) diferențierea sub control microscopic în alcool-anilină 0,1‰, până ce doar nucleii sunt puternic colorați în roșu strălucitor; 9) oprirea diferențierii în alcool-acetic 1% 1—2 minute. Trecere în apă distilată; 10) colorare 5 minute în oranj G 2 g în 100 cc acid fosfomolibdic 1%. Scurtă spălare cu apă distilată; 11) trecere 5 minute în acid fosfomolibdic 5%. Uscare cu o hârtie de filtru; 12) colorare 40 de minute în albastru de anilină 0,5% cu 8% acid acetic diluat 1/3 cu apă. Scurtă spălare în apă distilată. Diferențiere în alcool. Deshidratare, montare în balsam acid.

Rezultate. Această excelentă metodă, cu toate că durează mai mult timp, dă în schimb cele mai frumoase imagini. Nucleii sunt colorați în roșu-strălucitor; celulele α sunt portocalii; celulele β sunt albastre-închis spre brun, celulele cromofobe sunt albastre-violete-palid, țesutul conjunctiv albastru. Pituicitele se colorează după metoda următoare:

§ 1020. — 1) Fixare în Bouin sau Carnoy. Secțiuni la parafină; 2) impregnarea secțiunilor la parafină după Wilder sau Gömöri (§ 910). Spălare în apă curentă 30 de minute; 3) colorare în fuxină acidă 2% ușor acidulată 5 minute. Spălare în apă distilată; 4) trecere în acid fosfomolibdic 1% 5 minute. Apă distilată, apă acetificată 1%, uscare cu hârtie de filtru, alcool absolut, xilen, montare în ulei de cedru.

Rezultate. Fibrele de reticulină sunt colorate în negru, fibrele pituicitelor sunt colorate în roșu-intens.

§ 1021. — Fibrele pituicitelor se pun în evidență cu metoda următoare: 1) fixare în formol 10%, includere la parafină, secțiuni, de parafinare; 2) colorare în vas închis în protargol timp de 12—14 ore la 37°. Protargolul se prepară la suprafața paharului Borrel pentru colorare și este lăsat să se disolve singur, *fără a agita!* (Se calculează și rezultă o soluție de protargol 1%. Se adaugă în vas 3 g de cupru «*pro analysi*» în granule sau fire). Spălare în apă distilată, schimbată de două-trei ori; 3) trecere în revelator (hidrochinonă) 1 g, sulfit de sodiu 5 g, apă distilată 100 cc) timp de 10 minute. Spălare în apă distilată de două-trei ori; 4) trecere în soluția de acid oxalic 2% circa 5 minute sub control microscopic: fondul nu trebue să fie prea închis la culoare, iar fibrele nervoase trebue să fie albastre-închis; 5) spălare în apă distilată de două-trei ori; 6) tiosulfat de sodiu 5% timp de 5 minute; 7) supracolorare după metoda Azan (§ 903) sau în soluție de albastru de anilină (albastru de anilină 0,1 g, acid oxalic 2 g, acid fosfomolibdic 2 g, apă distilată 300 cc) pentru 2—3 minute. Spălare în apă distilată; 8) deshidratare, xilen, balsam.

Rezultate. Fibrele nervoase sunt negre, celelalte elemente sunt purpurii. Dacă am supracolorat în Azan, fibrele nervoase sunt negre, fibrele pituicitelor sunt violete, iar conjunctivul e albastru.

GLANDELE SUPRARENALE

§ 1022. — Fixarea pentru colorații generale se face în Susa, sublimat acetic, Zenker. Includere la parafină. Preparate generale frumoase pentru punerea în evidență a conjunctivului și celulelor dă metoda Azan. Pigmentul din stratul reticular al corticalei suprarenale apare foarte frumos pe preparate colorate cu metoda Nissl. Pentru medulosuprarenală se recomandă metoda dela § 1023 sau reacția cromafină urmată de o colorare a nucleilor și celulelor.

§ 1023. — Metodă pentru colorarea celulelor cromafine.

Tehnica: 1) fixare în amestecul bicromat de potasiu 5% 10 cc, formol 1% 20 cc, apă distilată 20 cc, 1—4 zile; 2) supracromare în soluție apoasă de bicromat de potasiu 5% timp de 1—2 zile. Spălare în apă curentă 24 de ore; 3) includere la parafină, secțiuni; 4) colorare în soluție apoasă de toluidină 1%, timp de 20 de minute; 5) spălare în apă de robinet 5 minute; 6) colorare în soluție apoasă de safranină 1% timp de 20 de minute; 7) diferențiere cu alcool 96° până ce secțiunile devin din nou albăstrui; 8) xilen-fenolat, xilen, balsam.

Rezultate. Celulele cromafine sunt verzi. Nucleii sunt roșii. Citoplasma celorlalte celule e albastră.

§ 1024. — Reacția cromafină. Această reacție, specifică tuturor celulelor cromafine, se poate obține și prin următorul procedeu:

1) fixare 24 de ore în amestecul: soluție apoasă de bicromat de potasiu 3,5% 9 părți, formol 1 parte; 2) supracromare cu bicromat de potasiu 3,5% încă 3 zile; 3) spălare în apă curgătoare 24 de ore; 4) includere la parafină. Celulele cromafine devin brune; 5) secțiunile se mai pot supracolora cu Azan, tricromic, hemalaun sau Kernechtrot.

TIROIDA

§ 1025. — Fixarea se face în orice fixator, dar rezultate mai bune se obțin folosind Zenker-formol, Susa, formol. Dacă vrem să studiem coloidul din veziculele tiroidiene, se recomandă secționarea la microtomul cu ghiață, deoarece metodele de includere la parafină sau celoidină produc contracții în coloid. Intrucât însă secțiunile la ghiață sunt de obicei prea groase, se include totuși la parafină. Pentru studiul celulelor epiteliului se recomandă colorarea după metoda Bensley; pentru studiul coloidului, metoda Kraus.

§ 1026. — Ca metodă pentru studiul celulelor tiroidiene se recomandă următoarea (Bensley): 1) fixare în Zenker-formol, includere la parafină secțiunile lipite pe lamă cu apă sau foarte puțină albumină; 2) colorare câteva ore în soluție de brazilină (brazilină 0,05 g, acid fosfotungstic 1 g, apă distilată 100 cc. Brazilina se disolvă în puțină apă și se adaugă la soluția de acid. Soluția se poate folosi numai 3 zile); 3) spălare în apă; 4) colorare în soluția de albastru apos, acid fosfomolibdic 1 g, albastru apos 0,2 g, apă distilată 100 cc timp de 5 minute; 5) spălare rapidă în apă distilată, uscare cu hârtie de filtru; 6) alcool absolut, toluen, balsam.

Rezultate. Citoplasma e albastră până la violet. Cromatina roșie-închis. Conținutul vacuolar e albastru ca cerul. Picăturile coloidale intracelulare sunt colorate în albastru-închis sau roșu-închis.

§ 1027. — Pentru studiul coloidului se recomandă metoda următoare (Kraus): 1) fixarea organului foarte proaspăt în formol 1/9 la 37°; 2) includere la parafină, secțiuni de 3—5 μ; 3) colorare în albastru de metilen policrom 6 minute; 4) scurtă spălare în apă distilată; 5) diferențiere în tanin 25% până ce nu mai ies nori de culoare din secțiune; 6) colorare în amestecul fuxină-tanin (soluție fuxină acidă 5%, soluție de tanin 33%, glicerin eter, āā) până ce nucleii celulelor sunt albaștri-aprins, iar conjunctivul e roșu. (« Glicerin eter » este o fracțiune de distilare a glicerinei, care trece între 120 și 220°, iar nu un amestec de glicerină cu eter); 7) bună spălare în apă distilată; 8) supracolorare în fuxină acidă 2% timp de 1 minut; 9) scurtă spălare în apă distilată; 10) trecere în soluție de acid fosfomolibdic 1% timp de 30 de secunde; 11) spălare în apă, uscare cu hârtie de filtru, trecere rapidă prin alcool absolut, xilen.

Rezultate. Coloidul fuxinofob în albastru-deschis, coloidul fuxinofil în roșu-galben; coloidul taninofil în roșu-violet.

§ 1028. — Fixarea pentru colorațiile generale se face în Susa, Zenker, Bouin, Helly, pentru colorarea grăsimilor în formol 15%, iar pentru glicogen, fixare în Carnoy. Includere în parafină sau celoidină.

§ 1029. — Pentru evidențierea celulelor oxifile se recomandă colorări de contrast cu eozină, fuxină acidă, verde lumină, iar pentru colorarea granulațiilor celulare, metodele Regaud, Altmann.

PANCREASUL

§ 1030. — Pentru metodele generale fixarea se face în: Zenker, Zenker-formol, Susa, Bouin, Carnoy. Includere în parafină sau celoidină. Pentru colorare se recomandă metodele generale și cele de mai jos.

§ 1031. — Metoda generală pentru studiul pancreasului este următoarea: 1) fixare în Zenker, includere în parafină, lipirea secțiunilor pe lamă; 2) colorarea secțiunilor în hemalaun 12 — 20 de minute; 3) spălare; 4) diferențiere în alcool clorhidric până ce rămâne bine colorată numai cromatina; 5) bună spălare în apă curgătoare; 6) colorare în soluția de fuxină bazică (soluție concentrată de fuxină bazică în apă fenolată 5% timp de 24 de ore); 7) spălare în apă de robinet; 8) colorare foarte scurtă în soluție alcoolică de verde lumină (verde lumină 1 g, alcool 70°, 100 cc); 9) diferențiere în alcool clorhidric; 10) alcool absolut, xilen, balsam.

Rezultate. Cromatina nucleară colorată în albastru, nucleolii în albastru cu centrul roșu, filamentele bazale (ergastoplasma) în albastru; *granulații de prozimogen* în verde; *granulații de zimogen* în roșu.

§ 1032. — Metoda pentru studiul insulelor Langerhans. *Tehnica.* Fixare 6—8 ore în amestecul lui Zenker cu formol (Zenker 9 părți, formol 1 parte). Includere în celoidină. Secțiuni. Lipirea secțiunilor pe lamă după Rubașchin.

Secțiunile se scot din alcool 70° pe o lamă unsă cu albumină Mayer, se presează cu o hârtie de filtru. Se acoperă secțiunea cu esență de cuișoare sau benzoat de metil până la clarificare (5—20 de minute). Se trece de trei ori câte 10 minute în alcool de 95°, apoi în alcool metilic sau alcool-eter pentru a topi celoidina. Alcool 70°. Colorare după metoda Azan.

Rezultate. Celulele α din insulele Langerhans au granulații roșii; celulele β sunt oranj cu granulații cenușii-oranj; celulele γ au protoplasma albastră.

§ 1033. — Metoda Lane pentru studiul insulelor Langerhans. *Soluții necesare:* 1) fixator « A »: soluție saturată de sublimat în alcool 96° în părți egale; soluție de bicromat de potasiu 2,5% 2) fixator « B »: bicromat de potasiu 2,5 g; sublimat 5 g; apă 100 cc. 3) Colorant. Se amestecă 50 cc soluție apoasă saturată de violet de gențiana sau violet cris-

tal cu 50 cc soluție apoasă saturată de oranj G. Rezultă un precipitat care se spală bine cu apă distilată pe un filtru, apoi se usucă și se disolvă după uscare în 50 cc alcool metilic. Pentru colorare se pică din această soluție-mamă concentrată într'o cantitate de alcool 20° până la culoarea unui bun hemalaun. 4) Soluție de diferențiere: alcool absolut 1 parte, esență de cuișoare 3 părți.

Observație. Lane deosebește în insulele Langerhans două tipuri de celule « A » și « B ». Bensley mai găsește și celule « C » fără granulații.

Tehnica. 1) Pentru celulele « A » fixare 2—4 ore în fixator « A », apoi spălare în alcool 50°. Includere la parafină, secțiuni. Pentru celulele « B » fixare 24 de ore în fixator « B », spălare în apă, deshidratare, includere la parafină, secțiuni; 2) colorarea secțiunilor 24 de ore în amestecul colorant diluat; 3) uscare cu hârtie de filtru; 4) deshidratare în acetonă; 5) diferențiere în amestecul aclool esență de cuișoare, până ce granulele de zimogen din celulele exocrine sunt violete-purpurii pe fondul bruncafeniu; 6) xilen, balsam.

Rezultate. După fixarea « A » se văd în celulele « A » granulații fine intens colorate în violet; celulele « B » sunt slab oranj. După fixarea « B », aspectul este inversat.

§ 1034. — Metoda Bensley pentru insulele Langerhans este o modificare a metodei precedente. 1) Fixare în fixatorul « B » (1033), includere, secționare; 2) colorare 24 de ore în soluție de gențiană-oranj; 3) uscare cu hârtie de filtru; 4) fixare 5 minute în sol. 5% de molibdat de amoniu (proaspătă); 5) spălare în apă; 6) colorare în fuxină anilinată, ca în metoda Altmann, timp de 5 minute la 60 7) diferențiere în soluția alcoolică de acid picric 30%; 8) alcool absolut, xilen, balsam.

Rezultate. Granulele celulelor « A » sunt roșii, granulele celulelor « B » sunt violete.

§ 1035. — Metoda pentru colorarea ergastoplasmei (filamentele bazale). Fixare în Bouin sau Carnoy. Colorarea: 1) colorare cu metoda Dominici 20—30 de minute în amestecul eozină 0,5 g, oranj G 0,6 g, apă dist. 100 cc; 2) scurtă spălare în alcool 60°; 3) colorare 30''—1 minut în toluidină 0,5%; 4) diferențiere în alcool 96° până nu mai ies nori de colorant; 5) alcool absolut; xilen, balsam.

EPIFIZA

§ 1036. — Fixarea pentru cercetări generale se face în Susa, Bouin, formol. Trebue făcută o mențiune specială pentru faptul că deseori epifiza prezintă concrețiuni calcaroase (acervuli, nisip cerebral), care pot strica cuțitul microtomului la secționare; se recomandă deaceea fixare ceva mai lungă în Susa, care, conținând acid tricloracetic, decalcifică zonele mici calcificate. In cazuri speciale se va decalcifica într'un decalcificator special, după fixare. Includere în parafină sau celoidină.

Colorarea, în afară de metodele generale, se mai face după următoarele metode: pentru fibrele gliale fixare în Susa și colorare cu metoda Azan; pentru astrocite metoda cu sublimat-clorură de aur; pentru celulele pineale, metoda Hortega.

§ 1037. — Metoda Hortega pentru celulele pineale. Prepararea soluției Hortega concentrată: se amestecă 5 cc soluție de nitrat de argint 10% cu 20 cc soluție carbonat de sodiu 5%. Se formează un precipitat care se disolvă prin adăugare de amoniac pur. După disolvare se complectează cu apă distilată până la volumul total de 45 cc.

Observații.

— Toate substanțele utilizate în această metodă trebue să fie foarte pure (pro analysi), iar apa distilată, neutră, cu pH-ul controlat.

— Amoniacul se va picura dintr'o pipetă cu diametrul mic, pentru a evita excesul. Dacă totuși s'a pus prea mult amoniac, se va corecta adăugând 1—3 picături dintr'o soluție de nitrat de argint.

Tehnica: 1) fixare în formol 2—5 zile. Secțiuni la ghiață; 2) secțiunile sunt trecute 24 de ore în 10 cc soluție de nitrat de argint 2% + 3 picături de piridină. Secțiunile iau o culoare brună-deschis; 4) spălare în apă distilată cu 2 picături piridină la 10 cc apă; 4) impregnare în soluție Hortega + 3 pic. piridină pentru 10 cc soluție. Amestecul se încălzește la 50°, până ce secțiunile iau o culoare sepia; 5) spălare în apă distilată; 6) reducere în formol 1/10; 7) trecerea secțiunilor în sol. clorură de aur 1/500 la cald până ce capătă un ton violet; 8) spălare foarte rapidă; 9) trecere în tiosulfat de sodiu 5%; 10) spălare, deshidratare, montare.

TIMUSUL

§ 1038. — Fixare în Susa, Helly, Maximov. Includere în parafină. Fiind un organ limfopoetic, timusul se colorează de obicei cu metodele generale ale organelor hematopoetice. Pentru corpusculii Hassal se recomandă colorarea după Azan, Masson. Pentru studiul reticulului epitelial se procedează astfel: fragmentele foarte proaspete se lasă 2—3 zile în alcool 1/3. Se spală cu apă distilată. Se fac la ghiață secțiuni de 30—40 μ. Se colorează cu hemalaun și apoi se elimină celulele limfoide prin pensulare sau agitând într'o cantitate mică de apă.

OVARUL

§ 1039. — Fixarea este recomandabil să se facă în Susa, Bouin. Includere în parafină. Colorarea se face cu Azan, hematoxilină ferică, tricromic Masson. Pentru studiul grăsimilor și al glicogenului vezi « Tehnica histochimică ». Pentru condriom vezi « Citologia ».

§ 1040. — **Fixarea** pentru metode generale se face în Susa, Bouin. Dacă se fixează în formol, nu se trece direct în alcool 90°, ci în prealabil se întăresc 1—3 zile în bicromat 3%, apoi se spală în apă curgătoare şi se deshidratează. Dacă nu se procedează astfel, se produc mari deplasări ale canalelor seminale prin contracţie. Pentru studiul spermatogenezei se fixează în special în Carnoy, Zenker, Allen.

§ 1041. — Se recomandă în special includere mixtă în metilbenzoat-celoidină + parafină, care evită despărţirea canalelor seminale de glanda interstiţială.

§ 1042. — **Colorarea** cu hematoxilină ferică, metoda cu safranină-violet de genţiana oranj (vezi « Citologia »).

Cu această ultimă metodă se obţin următoarele rezultate: reţeaua de cromatină a nucleilor în perioada de linişte, spiremul şi dispiremul apar în violet. Asterul şi diasterul în roşu. Spermatozoizii au diversele piese (cap, coadă, piesa intermediară) colorate dela roşu-albăstrui la violet.

§ 1043. — Pentru punerea în evidenţă a cristalelor Leydig se fixează în alcool sau alcool-formol şi se colorează cu hematoxilină ferică sau violet de genţiană.

SISTEMUL NERVOS

§ 1044. **Generalităţi de tehnică.** Capitolul va cuprinde date asupra recoltării şi fixării pieselor, precum şi asupra punerii în evidenţă, prin colorări sau impregnări, a diferitelor detalii, citologice sau histologice, ce pot interesa. Tehnicile pentru sistemul nervos sunt foarte numeroase şi variate, ele fiind în raport cu animalul ce studiem, cu vârsta, cu porţiunea din sistemul nervos ce avem de cercetat, cu starea sa normală sau patologică şi mai ales cu datele ce voim a cerceta. Dacă la un organ oarecare, cum ar fi ficatul, comportarea este aceeaşi în tot întinsul organului, pentru sistemul nervos într'un fel vom studia o emisferă cerebrală, într'altul vom lucra fragmentele de nervi sau vom cerceta terminaţiile nervoase din organe.

§ 1045. — **Recoltarea** şi **orientarea** pieselor de sistem nervos sunt operaţii foarte importante, de ele depinzând reuşita cercetării noastre şi buna interpretare a rezultatelor. Aceste operaţii trebue făcute de un cunoscător în anatomia regiunii; ele nu pot fi lăsate, atunci când este vorba de cadavre, pe mâna autopsierilor, cu toată îndemânarea profesională ce pot avea aceştia. Fragmentele recoltate vor avea dimensiunile comandate de mărimea segmentului din sistemul nervos cercetat şi de întinderea leziunii găsite la necropsie, se va da o anumită formă acestui fragment, indicaţiece se va nota de altfel şi în caietul de cercetare,

pentru a fi uşor de regăsit piese, sau se va învălui aceasta în hârtie de filtru, pe care se vor scrie cu creionul date asupra regiunii recoltate. Deasemenea se va nota pe piesele impare, convenţional, prin o tăietură, partea care corespunde părţii drepte a cadavrului. Se va nota acest lucru şi în caietul de cercetări. In general se cere să se lucreze cu instrumente potrivite scopului urmărit, cuţite bine ascuţite, pense tăietoare speciale pentru deschis canalul rahidian la animale, ferestraie pentru cutia craniană, etc. Se recomandă în special să se manipuleze foarte delicat piesele de sistem nervos, mai ales atunci când sunt nefixate, pentru a nu se distruge structurile fine. Se recomandă deaceea să se facă mai întâi o întărire în fixator a întregului organ ce ne interesează şi apoi să se detaşeze fragmentele ce se vor studia în special. Aceste secţionări se vor face după anumite direcţii, comandate de anatomia regiunii şi de leziunea vizibilă sau bănuită; secţionările vor fi făcute cu cuţite cu lama subţire, tăioase, sau cu lame de ras montate pe pense, instrumente ce vor fi de altfel umectate în lichidul fixator.

§ 1046. — Pentru o mai bună recoltare a pieselor din sistemul nervos central se recomandă deasemenea, dacă este posibil, să se facă injectarea de lichid fixator prin inimă, aortă sau artera carotidă internă. Prin această operaţie se asigură o conservare şi prefixare a pieselor până la deschiderea canalului rahidian şi a cutiei craniene.

§ 1047. — Pentrucă de cele mai multe ori nu ştim unde vom găsi leziunile mai importante din sistemul nervos central, în cazurile anatomopatologice se recomandă ca după cercetarea macroscopică şi eventuala fotografiere a piesei, pentru uşurinţa reconstrucţiei, să se recolteze pentru cercetările macroscopice fragmente din regiuni precise. Restul organului se va păstra în fixator sau lichidul conservator. Spielmayer recomandă să se facă următoarele prelevări: din prima circumvoluţie frontală, din prima circumvoluţietemporală, din lobul insulei stângi, din cornul lui Ammon, din regiunea calcarină, din partea mijlocie a corpului striat, din talamus, din regiunea olivară a bulbului, din emisfera cerebeloasă cu nucleul dinţat. Din măduva spinării se vor lua unele fragmente secţionate transversal, iar altele longitudinal, din regiunile: cervicală, dorsală şi lombară şi mai ales dela nivelul îngroşări lor cervicale şi lombare. Vor fi recoltate, desigur, orice regiuni ce prezintă interes după aprecierea cercetătorului, enumerarea de mai sus fiind de altfel numai o schemă de lucru.

Pentru recoltarea nervilor se va avea multă grijă ca aceştia să nu fie striviţi cu foarfeca. Deaceea se recomandă, mai ales pentru nervii subţiri, să fie lipiţi mai întâi pe hârtie de filtru, la care ei aderă, şi apoi îi secţionăm cu hârtie cu tot; nervilor mai putem să le adăugăm o atelă, de carton sau lemn subţire, legând cu aţă cele două capete ale segmentului pe care vrem să-l recoltăm, dacă este vorba de nervi mai groşi, cum ar fi sciaticul sau alţi nervi groşi. Această operaţie este necesară ţinând seama de retractilitatea tubilor nervoşi.

§ 1048. — **Fixarea** pieselor din sistemul nervos trebue să se facă cât mai curând după moarte. Acest lucru este posibil pentru piesele recoltate dela animale. Pentru piesele dela om s'au căutat mijloace cât mai eficace pentru a împiedica alterarea cadaverică până la facerea necropsiei, printre care menționăm conservarea la frigorifere a cadavrelor, injectarea de soluții fixatoare pe cale sanguină sau prin trocare direct în cutia craniană, trecând prin lama ciuruită a etmoidului, sau injectânu-se lichide fixatoare prin calea rahidiană. In aceste cazuri se pot injecta soluții conservatoare de formol neutru (10%), după acest fixator putându-se realiza aproape toate tehnicile neurohistologice. Fixatorii cei mai obișnuiți pentru piesele de sistem nervos sunt: formolul, alcoolul, bicromatul de potasiu, amestecul bromură de amoniu-formol, serie la care mai putem adăuga fixatorii cu întrebuințări mai speciale ca: alcoolul amoniacal, soluția hidroalcoolică de hidrat de cloral, fixatorii mordanți pentru țesutul glial. Fixatorii din urmă pot servi ca primi sau secunzi fixatori. Alegerea fixatorului depinde de scopul ce urmărim în cercetare. Atunci când nu am decis încă direcția cercetării, în genere este bine să fixăm o serie de fragmente în formol și o alta în alcool de 95°. Vom găsi mijlocul, prin refixări ulterioare, să adaptăm aceste piese pentru toate scopurile. Insăși fixarea în alcool nu este absolut indispensabilă, reușind a obține printr'o refixare ulterioară aplicarea metodei de colorare Nissl, care cere o fixare a pieselor în alcool; este drept că rezultatele obținute vor fi mai puțin satisfăcătoare.

§ 1049. — **Formolul** utilizat în tehnicile neurohistologice este cel dat de soluția de aldehidă formică (40%), furnizată de diferite fabrici de chimicale. Se recomandă ca soluțiile utilizate să fie limpezi, nepolimerizate, având realmente conținutul de formol indicat pe etichetă. Din acest material se prepară soluțiile diluate întrebuințate curent (10—50%), socotind soluția comercială ca soluție-mamă (100%). Se recomandă a se neutraliza soluția-mamă, adăugând o cantitate de carbonat de calciu pulverizat în flacon, substanță ce va forma un depozit gros la fundul sticlei. Din acest flacon vom decanta formolul din care facem diluțiile necesare, cu apă distilată, rareori cu apă de robinet. Vasul în care facem fixarea trebue să aibă o gură largă, pentru a nu deforma piesele ce le introducem. Feliile mai subțiri din piese vor fi introduse cu ajutorul unei spatule largi. Pe fundul vasului se recomandă a se pune un strat de vată sau hârtie de filtru, pentru ca piesele să aibă contact cu fixatorul pe toată suprafața lor. Durata fixării variază cu grosimea piesei și cu scopul urmărit. Se va găsi indicația respectivă la fiecare tehnică.

Soluția de formol 10% poate servi și ca lichid conservator pentru piesele de rezervă sau care vor fi lucrate mai târziu.

§ 1050. — *Alcoolul etilic de* 96° este întrebuințat în fixarea pieselor de sistem nervos central pentru calitatea sa de a insolubiliza substanța cromatofilă din celulele nervoase; deasemenea este necesar pentru solubilizarea lipoizilor, favorizând astfel impregnările argentice din metodele Cajal și altele. Amestecul alcool-formol (10%) este utilizat în unele cazuri. Cercetătorii sovietici recomandă mult fixarea în amestecul alcool 96°, formol, soluție de acid arsenios 1% în părți egale, amestec care a fost introdus de savantul sovietic Lavrentiev.

§ 1051. — **Bromura de amoniu**, adăugată formolului, hidratul de cloral, precum și alte somnifere adăugate alcoolului, sunt substanțe adjuvante foarte folositoare în procesul de fixare a pieselor din sistemul nervos, pentru pregătirea aplicării tehnicilor speciale de punere în evidență a neurofibrilelor, sau pentru țesutul glial. Indicațiile cantitative vor fi date odată cu tehnicile speciale.

§ 1052. — **Bicromatul de potasiu** este utilizat ca fixator al pieselor de sistem nervos în multe cercetări, cum ar fi în amestecul cu acid osmic pentru tehnica Golgi sau în soluția Müller (ca și în soluțiile de supracromare) pentru insolubilizarea mielinei, în vederea colorării ei cu soluțiile colorante hematoxilinice.

Fixatorul mordant Weigert este un amestec complex, în care intră fluorura de crom, acetatul de cupru, formolul și acidul acetic și este utilizat în metoda Weigert pentru punerea în evidență a nevrogliei fibrilare. Amestecurile fixatoare din tehnica generală histologică sunt întrebuințate în neurohistologie atunci când dorim o vedere generală histologică, sau pentru scopuri speciale: condriom, glicogen, etc.

§ 1053. — Secționările pieselor recoltate și fixate pentru studiul sistemului nervos se fac deseori la microtomul cu congelare. Altădată s'a lucrat și pe piese secționate cu briciul de mână când nu era nevoie de secțiuni prea fine (100—200 μ). Pentru această secționare se lucra pe piese bine întărite în formol sau bicromat de potasiu, sau se suplea fragilitatea pieselor intercalându-se între două fragmente dintr'un alt organ mai dur, cum ar fi un ficat cirotic. Metoda a fost recomandată și întrebuințată pentru coloratia Nissl. Astăzi nu se mai practică. Secționarea la microtomul cu congelare (înghețare prin zăpadă carbonică) se utilizează mult astăzi, fiind rapidă. Ea se aplică pentru cercetări generale, de orientare topografică după o colorație uzuală, dar mai ales pentru unele impregnări argentice, cum ar fi metoda Bielschowsky, pentru neurofibrile, sau metoda Del Rio y Hortega pentru oligodendroglie și microglie. Pentru cercetarea grăsimilor, secționarea la ghiață constitue metoda de selecție.

§ 1054. — Pentru piesele mai mari sau constituite din porțiuni cu densitatea tisulară variată, este indicată includerea pieselor în celoidină sau colodiu, înainte de secționare. Timpii pregătitori ai includerii sunt aceiași ca în tehnica generală histologică, fiind adaptați, în ceeace privește durata lor, la mărimea pieselor. Deshidratarea se face tot prin alcool, având grijă să prelungim mult șederea în alcool de 95° și în alcool absolut, în funcție de mărimea pieselor.

§ 1055. — După experiența Laboratorului de Histologie al Facultății de Medicină București (prof. dr. I. T. Niculescu), pentru piese

de mărimea unei protuberanțe de om este nevoie de o deshidratare și o pregătire a piesei pentru includere, după cum urmează: alcool 95° 14 zile, alcool absolut 10 zile, alcool eter 5 zile, celoidină subțire 4% 15—20 de zile, celoidină groasă 8% 5 zile, în care se toarnă piesa. Formarea blocurilor de celoidină trebue făcută cu îngrijire, luând seama la orientarea piesei, în raport cu leziunea de studiat. Lipirea blocurilor pe suportul de lemn se va face cu colodiu subțire. Secționarea la microtomul special de celoidină va constitui o operație care va fi executată cu cea mai mare atenție, lucrând cu un cuțit bine ascuțit și umectând continuu suprafața piesei și cuțitul cu alcool de 70—80°. Grosimea secțiunilor va fi în raport cu tehnica de cercetare ce va urma, fiind necesare uneori secțiuni subțiri de 10—15 μ, alteori groase de 25—40 μ, în primul caz de exemplu pentru colorația Nissl sau impregnări, în al doilea, pentru tehnicile de mielină. Pentru secțiunile seriate se va reține câte o secțiune la 4—5, care va fi trecută spre colorare, celelalte vor fi adunate în pachete, învăluite în hârtie subțire, legate sul și păstrate în alcool 80°, în borcanul în care se păstrează și restul piesei nesecționate.

§ 1056. — Pentru piesele mici, cum ar fi ganglionii rahidieni, se poate face o includere în parafină. Deasemenea, pentru cercetarea terminațiilor nervoase în organe se întrebuințează includerea la parafină, când vrem a avea secțiuni subțiri. Includerea, secționarea și comportarea ulterioară cu secțiunile respective sunt operații ce se fac după aceleași norme ca în histologia generală. Deasemenea pot fi incluse în celoidină sau parafină piesele ce au suferit, după fixare, impregnarea pe bloc. Comportarea este aceeași; secțiunile pot fi uneori montate apoi pe lamă fără o altă colorare.

§ 1057. — **Includerea în gelatină** este întrebuințată în neurohistologie când avem de lucrat piese mici, cum ar fi ganglionii, care vor trebui să fie secționați la microtomul cu congelație: 1) fixare în formol (10—20%); 2) spălare în apă pentru 24 de ore, pentru scoaterea formolului; 3) trecerea în sol. gelatină subțire, la 37°, 24 de ore; 4) trecere în sol. gelatină groasă, la 37°, 3—4 ore; 5) se va răci până la solidificare. Se va face blocul cu ajutorul unui cuțit; 6) trecere în sol. 10% formol pentru a fi clarificat (24—48 de ore); 7) secționare la microtomul cu congelare, procedând cu secțiunile ca și cu cele dela secțiunea obișnuită la ghiață; 8) la montarea secțiunilor se adaugă la alcoolul de deshidratare 2 picături de amoniac și 5 picături de creozot. Creozot. Uscare cu hârtie de filtru. Montare în balsam.

§ 1058. — Cele două gelatine prezentate mai sus se prepară în felul următor: *Gelatină subțire*: 5 g gelatină foi, albă, chimic pură, 0,5 g cristale fenol, 100 cc apă. *Gelatină groasă* se prepară cu 10 g gelatină %

§ 1059. — **Evidențierea macroscopică a contrastului de culoare dintre substanța cenușie și substanța albă din piesele de sistem nervos central.** Pentru a face acest contrast mai aparent, în scop de demonstrare rapidă

de piese macroscopice, se recomandă trecerea feliei de piesă mai întâi într'o soluție de clorură de fier, apoi spălare și trecere într'o soluție apoasă de ferocianură de potasiu. Prin acest mijloc, substanța cenușie apare colorată în albastru-închis, iar substanța albă ia o culoare albastră foarte deschisă. In scopul pregătirii de piese permanente pentru demonstrații macroscopice, se utilizează felii din organe fixate în formol, care sunt spălate 24 de ore în apă de robinet și alte 24 de ore în apă distilată. Astfel pregătite, piesele sunt cufundate și ținute timp de 1—2 minute în cantități mari din soluția: fenol cristalizat 40 g, sulfat de cupru cristalizat 5 g, acid clorhidric concentrat 1,25 cc, apă 1000 cc. Baia se face la temperatura de 60—65°, trecându-se câte 1—2 felii odată. Se spală apoi în apă rece de robinet și se trec în: sol. cloruroferică 1% în apă distilată, timp de 2 minute. Spălare apă curgătoare: 5 minute. Trecere în sol. fericianură de potasiu 1%, până ce substanța cenușie ia o culoare albastră strălucitoare (aproximativ 3'). Spălare apă curgătoare: 24 de ore. Conservare în: formol 10 cc, alcool 70° 90 cc.

§ 1060. — **Disocierea țesutului nervos.** Această operație, foarte întrebuințată în primele faze ale neurohistologiei, pentru stabilirea aspectelor morfologice ale neuronilor, este astăzi utilizată numai în cazuri speciale. Pentru celulele nervoase și nevroglice putem obține preparate sub forma unei pelicule, luând un fragment proaspăt de 1—2 mm grosime dintr'o anumită regiune a sistemului nervos, de preferat dela un animal de talie mai mare, și se strivește acest fragment între două lame de sticlă. Fragmentele luate din cornul anterior al măduvei spinării, din cornul lui Ammon, din nucleii cenușii dela baza creierului, dau rezultate bune. Acest preparat se fixează prin uscare la aer sau, mai bine, se trece în alcool 96° și apoi se usucă. Colorarea se face cu sol. 1% albastru de metilen, sau cu orice alt colorant bazic de anilină, timp de 2—3 minute. După spălare, uscare, montare în balsam de Canada, se obține un preparat satisfăcător pentru morfologia generală celulară. Metoda este utilizabilă pentru demonstrații rapide morfologice și a fost propusă pentru un diagnostic rapid al turbării, făcând preparate din cornul lui Ammon (Rivenzon și Iliescu).

§ 1061. — Disocierea celulelor se poate obține și prin mijloace chimice, cum ar fi alcoolul 1/3, serul iodat, bicromatul de potasiu sau acidul cromic, în soluții foarte diluate. Disocierea se obține uneori în 24 de ore, alteori este nevoie de 7—14 zile, după care timp adăugăm și acțiunea factorilor mecanici de disociere, scuturarea lichidului sau disocierea cu acele. Celulele nervoase izolate, sau celulele nevroglice, pot fi studiate necolorate, pe preparate montate în apă sau glicerină, sau pot fi colorate ușor cu eozină, fuxină acidă sau soluții slabe de albastru de metilen.

§ 1062. — Disocierea nervilor, pentru studiul fibrelor nervoase, în special al strangulațiilor și tecilor, este o metodă întrebuințată în demonstrațiile de histologie. Ea se face pe piese proaspete sau pe piese tratate

cu acid osmic, nitrat de argint sau clorură de aur. Tehnica şi aplicaţiile ei vor fi făcute odată cu studiul sistemului nervos periferic (§ 1060).

A. TEHNICI PENTRU SISTEMUL NERVOS CENTRAL

§ 1063. — Pentru uşurinţa expunerii şi utilizarea comodă a manualului de tehnică este folositor să se trateze separat tehnicile recomandate pentru studiul sistemului nervos central de cele pentru sistemul nervos periferic, deşi prezintă multe puncte comune; deaceea fatal vor fi repetări sau trimiteri la metodele deja expuse, deseori nefiind vorba decât de adaptări ale aceloraşi metode. Pentru sistemul nervos central nu este nevoie să se dea metode pentru fiecare segment al sistemului, deoarece avem aceleaşi comportări tehnice, variaţiile ţinând de aplicarea uneia sau alteia din metodele propuse, în raport cu dimensiunea segmentului şi scopul urmărit. In cercetarea sistemului nervos central avem de urmării aspectele morfologice ale: *a)* celulelor nervoase; *b)* fibrelor nervoase; *c)* ţesutului glial; *d)* ţesutului conjunctiv şi vaselor. Pentru ultimele elemente structurale (conjunctiv şi vase) nu avem metode speciale aparţinând sistemului nervos, ci numai aplicarea tehnicilor respective din histologia generală.

METODELE PENTRU CELULA NERVOASĂ

§ 1064. — Inainte de a cerceta structura celulei nervoase trebue să ne orientăm asupra raporturilor dintre neuroni, având nevoie să privim fiecare segment al sistemului nervos ca un întreg şi apoi să-l desfacem în componenţi. Aranjamentul celulelor nervoase dintr'un segment sau dintr'un nucleu poate fi urmărit cu oarecare greutate şi prin metodele de coloraţie generală, din tehnica histologică. Acest aranjament este cercetat însă cu înlesnire prin aplicarea sistematică a metodei de coloraţie Nissl (şi derivatele ei), pe care o vom cerceta mai departe. Această metodă pune în evidenţă, cu electivitate, un anumit detaliu structural din celulă, dar ne poate da şi o admirabilă vedere generală asupra preparatului, pe care găsim trasate estompat şi alte detalii topografice, în afară de celule. Deaceea, această coloraţie constitue şi o metodă de cercetare, nu numai una citologică (§ 1075).

Cercetarea formei generale şi a raporturilor reciproce dintre neuroni

§ 1065. — Pentru studierea morfologiei generale a neuronilor se utilizează metoda cu cromat de argint. Această tehnică a fost introdusă

de Golgi (1894) şi se întrebuinţează fie metoda originală, fie modificări ale acesteia. Metoda Golgi se bazează pe formarea unui precipitat de cromat de argint pe piese din sistemul nervos fixate în bicromat de potasiu (cu adaus de acid osmic) şi tratate apoi cu nitrat de argint. Precipitarea se face pe traiectul celulelor nervoase şi al prelungirilor lor, care apar ca siluete negre pe un fond necolorat. Deseori se mai fac depuneri şi pe vasele sanguine şi unele fibre conjunctive. Deasemenea se produc precipitate mari, negre, în blocuri, la periferia piesei.

Această metodă este destul de empirică şi nesigură în rezultatele ei, având nevoie de tatonări în ceeace priveşte durata timpilor din tehnică. Numai la o anumită adâncime din piesă se obţin rezultate optime, defect întâlnit de altfel în mai toate impregnările metalice făcute pe bloc. Deaceea se recomandă să se pună mai multe fragmente din piesă în fixator şi apoi zilnic să se treacă câte una în baia de nitrat de argint.

Rezultatele obţinute, atunci când impregnarea reuşeşte, sunt atât de remarcabile în privinţa aspectului general al neuronului, în întregul său, încât metoda a rămas încă de întrebuinţat. Faptul că nu toţi neuronii sunt impregnaţi uşurează citirea preparatelor şi evidenţiază individualizarea. Rezultatele cele mai bune sunt obţinute pe piese provenind dela animale cât mai tinere.

§ 1066. — **Metoda Golgi** se cunoaşte în mai multe forme, cea originală fiind modificată în cursul timpului de însuşi autorul ei. Mai utilizată este cea numită *metoda Golgi rapidă* care necesită următoarele soluţii: *a)* soluţie bicromat de potasiu 5%, *b)* soluţie acid osmic 1%, *c)* soluţie nitrat de argint 1%.

Tehnica: 1) recoltare de piese proaspete, dela animale tinere. Se recoltează mai multe fragmente, groase de cel mult 3—4 mm şi având lungimea de 5—10 mm din creier, cerebel sau măduva spinării; 2) fixarea mai multor fragmente în amestecul: sol. bicromat de potasiu 3—5%, 4 părţi, sol. acid osmic 1%, 1 parte. Durata fixării este de 2—8 zile. Soluţia fixatoare se pune în borcane colorate; cantitatea de fixator trebue să fie suficientă şi, pentru ca piesele să aibă contact cu fixatorul pe întreaga lor suprafaţă, pe fundul borcanului se va pune vată de sticlă. Dacă lichidul fixator se turbură, el va fi preschimbat. De durata fixării depinde reuşita impregnării şi deaceea se procedează precum urmează: 3) începând dela a doua zi se scoate câte un fragment din fixator, se spală cu apă distilată, se usucă pe hârtie de filtru şi se trece la timpul următor; 4) se cufundă piesa la început într'o cantitate mică din sol. 1% nitrat de argint, pentru a scăpa de masiva precipitare de cromat de argint ce se formează la suprafaţă. Când nu mai apar precipitate se trec piesele într'un alt vas, cu baia argentică definitivă, proaspăt preparată şi care este o sol. 0,75—1% nitrat de argint. Soluţia argentică se pune în borcan colorat, sau la întuneric, la temperatura camerei sau la termostat 37°. Este mai bine ca piesele să fie suspendate în soluţia de nitrat de argint.

Durata impregnării este de 1—6 zile (variația mare de durată permite încercarea și a acestui timp, scoțându-se câte o piesă în fiecare zi, pentru a urma restul tehnicii); 5) se spală fragmentele în alcool 80°, schimbat de mai multe ori, pentru a scăpa de precipitate; 6) fragmentele pot fi: *a)* secționate cu briciul de mână, după întărirea în alcool 95° (sau de găsit un alt mijloc pentru a se înlesni secționarea cu mâna), obținând astfel secțiuni groase de 80—100 μ; *b)* hidratate, pentru a fi secționate la microtomul cu congelare; *c)* pregătite pentru includere rapidă în celoidină sau parafină; 7) secțiunile sunt spălate în alcool 80°, pentru a scăpa de argintul de prisos dela suprafață; 8) se complectează deshidratarea în alcool absolut; 9) clarificarea în creozot, ulei de cedru sau oleu terpini, evitându-se xilenul (mai ales pentru secțiunile dela celoidină); 10) secțiunile sunt trecute cu spatula pe lamă, întinse bine, se scurge lichidul de clarificare și se montează în balsam de Canada, mai puțin fluid, punând un număr mare de picături, astfel ca întreg preparatul să fie bine cuprins în balsam. Se lasă să se usuce la un loc ferit de praf, fără a se acoperi preparatul cu lamela, evitând astfel ruperea preparatului prin presiunea lamelei, secțiunile fiind sfărâmicioase. Secțiunile mai subțiri pot fi montate și sub lamelă, preparatele păstrându-se însă mai puțin bine.

Rezultate. In preparatele reușite se obține punerea în evidență a celulelor nervoase cu prelungirile lor, apărând în negru-închis pe un fond deschis, gălbui. Este aspectul cunoscut sub numele de silueta neagră a neuronului. Nu putem studia decât forma celulelor și uneori raporturile dintre ele, nu toți neuronii fiind impregnați. Se impregnează și nevroglia fibroasă, care se recunoaște prin morfologia sa caracteristică.

§ 1067. — Modificări ale metodei Golgi. Pentru o mai bună reușită a impregnării, reactivii utilizați neavând o putere mare de pătrundere, Cajal a recomandat o repetare a timpilor operativi. Convingându-ne, prin examinarea unei secțiuni groase după timpul (5), că impregnarea nu a reușit bine, se trec din nou piesele în soluția de bicromat de potasiu cu acid osmic, pentru ca apoi să repetăm și trecerea prin baia de nitrat de argint. Operația se mai poate repeta încăodată. In acest mod putem avea un rezultat mai sigur.

§ 1068. — Pentru piesele provenind dela animalele adulte sau dela necropsie, se recomandă aplicarea unei modificări de tehnică în ceeace privește fixatorul: *a)* sol. 3,5—5% bicromat de potasiu 100 cc, formol comercial 2,5—5 cc. Durata fixării este de 5—6 zile; după care urmează ceilalți timpi ai tehnicii sau *b)* sol. 3,5% bicromat de potasiu 80 cc, formol 20 cc, durata fixării fiind de 24 de ore, urmând o supracromare în sol. 3% bicromat de potasiu, timp de 3—6 zile. Se continuă apoi ceilalți timpi ai metodei. Se recomandă și în aceste modificări tatonarea timpului de fixare și impregnare. Dăm câteva durate medii pentru impregnare: pentru celule și fibre gliale 2—3 zile, pentru celule nervoase din centri 3—5 zile, pentru fibre nervoase 5—7 zile.

§ 1069. — Roschin, în tehnica sa microscopică (1951), ne dă o serie de modificări ale metodei Golgi, cu o mai largă întrebuințare.

§ 1070. — Modificarea metodei Golgi recomandată de Kollason. Fragmentele se țin 1—7 zile în amestecul în părți egale din sol. 3—5% bicromat de potasiu și sol. 0,25% acid osmic. Se spală cu apă distilată, se usucă pe hârtie de filtru și se trec în sol. 0,75% nitrat de argint, căruia i se poate adăuga și acid osmic 0,25—0,50%. In această baie piesele stau 2—3 zile.

§ 1071. — Modificarea metodei Golgi, recomandată de Tisutchin. Aplicând această metodă pentru studiul inervației organelor, tehnica nu trebue să fie rigidă, ci trebue să se modifice pentru fiecare organ, pentru a se obține o impregnare optimă. Pentru organe se recomandă o fixare scurtă, cel mult de 2 ore. Pentru impregnarea nervilor din splină, de exemplu, se recomandă o fixare la 37°, timp de 1/2—2 ore, în amestec în părți egale din sol. 5% bicromat de potasiu și sol. acid osmic 1%. Piesele se trec apoi în sol. 1—2% NO_3Ag.

§ 1072. — Modificarea Culcițchi. Piesele sunt fixate în sol. 4% formol, timp de o zi, sau un timp mai lung. Se trec apoi în amestecul: bicromat de potasiu 3 g, cloral hidrat 1 g, apă distilată 100 cc timp de 1—2 săptămâni. Impregnarea se face în sol. 2% nitrat de argint, la care se adaugă 1% cloralhidrat. In această baie se țin piesele până la o reducere suficientă a argintului.

§ 1073. — O altă modificare a metodei Golgi, care are avantajul rapidității și economiei, putând fi aplicată și pe piese fixate mai demult în formol, este următoarea: 1) fixare în soluție de formol 1/9, câteva zile; 2) fragmente mici (groase de 2—3 mm și 5—6 mm pe latură) sunt cromizate în soluția de 2,5% bicromat de potasiu, la 34°, timp de 2 zile; 3) se usucă pe hârtie de filtru. Se stropesc fragmentele cu soluția 2% nitrat de argint, trecându-se apoi în 4) baia de nitrat de argint, soluția 3% la 34°. Durata 1—2 zile; 5) includere rapidă în parafină (timp de 1—2 zile); 6) secționare—lipire pe lame—uscare—deparafinare. Secțiunile se acoperă cu balsam. Metoda este recomandată pentru preparatele necesare lucrărilor practice și demonstrațiilor.

CORPUL TIGROID ȘI NUCLEUL CELULAR

§ 1074. — Pentru citoarhitectonia centrilor nervoși, adică pentru aranjamentul celulelor în formațiunile nervoase, cât și pentru structura însăși a celulei nervoase, posedăm o serie de metode de colorare, care sunt destul de ușoare în aplicarea lor și suficient de constante în rezultate. Mai toate metodele se bazează pe punerea în evidență în corpul celular a substanței cromatofile, care se poate prezenta sub diferite aspecte: pulverulentă, granulară sau în bulgări mari, și a cărei totalitate constitue corpul tigroid, descris de Nissl. Până la un punct, buna funcționare a celulei nervoase este în raport cu integritatea acestei sub-

stanțe, deaceea cercetarea sa este importantă atât în cercetări experimentale, cât și în cele anatomopatologice. Punerea în evidență a substanței cromatofile servește atât pentru studii topografice ale centrilor nervoși, cât și pentru cercetarea integrității sau modificărilor patologice ale celulelor. Ea se disolvă în apă distilată la temperatura de 65° și nu se pune în evidență prin reacția nucleală Feulgen. Metoda originală, descrisă de Nissl, constă în: *a)* utilizarea de piese proaspete, fixate în alcool 96° care insolubilizează granulațiile cromatofile din celulele nervoase; *b)* colorarea acestor granulații cu albastru de metilen, care se fixează cu electivitate pe acest detaliu structural; *c)* prin diferite substanțe diferențiatoare se extrage excesul de colorant din preparat, rămânând puse în evidență electiv granulațiile cromatofile din celule și nucleolul celular, pe un fond decolorat, în care putem urmări totuși schema generală structurală a preparatului.

Acesta este principiul colorației Nissl, care a suferit oarecare modificări în cursul timpului. Aceste modificări au adus o lărgire a utilizării și o ușurință în aplicare a metodei de colorare. S'au putut utiliza piese ce suferiseră alte fixări anterioare și s'au putut întrebuința și alți coloranți albaștri, tot bazici, cum ar fi tionina, violetul de metil, etc., mai ușor de preparat. S'a încercat să se facă și o analiză tinctorială a compoziției granulațiilor Nissl prin utilizarea colorației cu galocianină și albastru de galamină.

§ 1075. — Metoda de colorație Nissl este o metodă de cercetare cu largă utilizare în neurohistologie. Metoda originală a suferit modificări care au condus la perfecționarea sa, putând fi aplicată cu rezultate sigure. Se utilizează ca fixator alcoolul de 96°, iar pentru colorare soluție 1% tionină, sau soluție albastru de metilen 1%, sau soluție violet de crezil 1%, sau sol. toluidină 1%. Din aceste soluții, făcute cu substanțe cât mai pure, se pot face diluțiile dorite (1/500 sau 1/1 000). Pentru diferențiere se întrebuințează următorul amestec (lichidul Gothard): creozot pur 50 cc, xilen 50 cc, ulei de cajeput 40 cc, alcool absolut 150 cc. *Tehnica colorației*: 1) se recoltează fragmente, cu dimensiuni în raport cu regiunea de studiat, groase de 6—8 mm și cu latura nu mai mică de 1 cm, imediat după sacrificarea animalului sau dela om, cât mai curând după moarte (cel mult după 12 ore); 2) se fixează, fără a fi spălate în apă, în alcool de 96°. Cantitatea de fixator trebue să fie în raport cu mărimea piesei (de 50 de ori cât piesa) și pusă într'un borcan cu gura largă și capac bine închis. Vată sau hârtie de filtru la fundul borcanului. Durata fixării: 7—8 zile. Se schimbă alcoolul la 2 zile. Dacă piesele sunt prea groase, pot fi subțiate, la mijlocul timpului de fixat; 3) după fixare, piesele sunt pregătite pentru includere. Ținând seamă de mărimea pieselor și de structura țesuturilor componente, este indicată includerea în celoidină.

In metoda originală Nissl se recomandă ca piesele care au o întărire suficientă să fie lipite cu gumă arabică pe un bloc de lemn și apoi secționate. Iată procedeul care are avantajul câștigării de timp, față de includerea în celoidină. Piesele, după scoaterea din alcoolul fixator, sunt uscate pe hârtie de filtru și apoi lipite cu soluție siropoasă de gumă arabică în apă, pe un suport de lemn. Când guma arabică începe a se usca, se introduce tot dispozitivul, în alcool 96°, care întărește guma arabică. Când întărirea este completă, se taie la microtomul de celoidină. Se umectează bine cu alcool, atât piesa, cât și cuțitul, mai ales partea posterioară a acestuia, pentru a împiedica înfășurarea secțiunii. Secțiunile vor fi groase de 10—15—20 μ.

De cele mai multe ori includerea se face în celoidină, în vase cu capac, bine închise. Durata deshidratării (alcool 95° și absolut), ca și a trecerilor în alcool eter și în băile de celoidină, variază după mărimea pieselor. Graba în operațiile de includere duce deseori la o pierdere a piesei. Durata includerii poate ține uneori chiar 3—4 luni; 4) secțiunile sunt trecute în baia de colorant. Se întrebuințează soluții apoase 1/1 000, de tionină, toluidină, violet de crezil sau albastru de metilen. Soluțiile trebue filtrate cu îngrijire. Cantitatea de colorant trebue să fie abundentă. Colorarea se poate face fie la temperatura camerei, în 6—24 de ore, fie la termostat, la 52°, în 1/2—1 oră. O colorație mai rapidă se obține încălzind, cu o flacără de alcool, baia de colorant, de mai multe ori, până la apariția de vapori. Metoda de colorație este regresivă, și diferențiatorul va corecta supracolorarea; 5) se trec secțiunile în apă distilată, pentru spălare și îndepărtarea excesului de colorant. Se trec apoi în alcool 96° pentru a le deshidrata și pregăti pentru diferențiere. Încă din timpul trecerii în alcool începe extragerea surplusului de colorant, care se completează în: 6) timpul de diferențiere, prin amestecul de mai sus. Se pune acest lichid în mai multe cristalizoare (2—3). Se trec secțiunile în fiecare, repede, cu ajutorul spatulei și al acelor de disociat, până la decolorarea dorită. Operația trebue făcută cu grabă, puterea diferențiatoare a acestui lichid fiind foarte mare. Durata diferențierii este de 1—3 minute, după grosimea secțiunii și intensitatea colorării. Se va controla sub microscop mersul diferențierii. Se oprește aceasta, trecând secțiunile în alcool absolut și se trece secțiunea pe lamă, pentru un rapid examen microscopic. Cu timpul, operatorul își va deprinde ochiul pentru a stabili momentul unei diferențieri suficiente, după gradul de decolorare a fondului; 7) secțiunile stau în alcool 2—3 minute, se trec apoi în xilen pur, unde rămân 10—15 minute, pentru o clarificare cât mai completă. Acest moment de tehnică asigură o bună conservare a culorii secțiunii, pentru ca să nu rămână urme de diferențiator pe preparat, ceeace ar aduce o continuare a decolorării, în cursul vremii. Se recomandă trecerea prin 2—3 băi de xilen; 8) montare în balsam de Canada neutru. Se va avea grijă a se pune pe preparat un număr suficient de picături de balsam, ținând seama de întinderea preparatului, pentru a nu pătrunde bule de aer între lamă și lamelă. Se pun preparatele să se usuce la termostat la 37°, câtva timp sau se lasă pe masa de lucru, acoperite, deoarece lumina solară le decolorează.

Rezultate. Fondul decolorat permite totuşi o bună orientare în topografia regiunii. Fibrele nervoase din zonele mielinice sunt complect decolorate, rămânând numai nucleii slab colorați. In substanța cenuşie găsim cu uşurință cuiburile de celule nervoase, chiar şi cu obiectivele slabe. Cu obiectivele puternice putem studia substanța cromatofilă. Cu cât coloraţia este mai reuşită, cu atât granulaţiile sunt mai evidente, mai izolate, colorate în albastru-violet, pe fondul palid al celulei. Nucleolul şi membrana nucleară sunt intens colorate. Preparatele bine păstrate, la adăpost de lumină, se pot conserva mulți ani. Fixarea în alcool a pieselor, substanțe colorante de calitate bună (tionina), precum şi o tehnică îngrijită, cu o clarificare prelungită, sunt factorii care asigură reuşita.

§ 1076. — Modificări ale tehnicii Nissl constau în: schimbarea unor timpi ai tehnicii date, utilizarea pieselor care au fost recoltate în sălile de necropsie şi fixate în formol, sau modificări în compunerea şi modalitatea de aplicare a diferențiatorului.

§ 1077. — Metoda Nissl pe piese fixate în formol. Metoda Nissl este atât de folositoare, prin rezultatele ei, încât trebue găsite modalităţi de a utiliza materialul recoltat în prosecturi şi fixat ca de obicei în formol.

Tehnica: 1) se spală piesele, deja fixate, cel puțin 2 zile în apă curgătoare; 2) micşorarea pieselor, adaptându-le tehnicii Nissl; trecere în alcool 70° timp de 10—15 zile, apoi în alcool 96° alte 10—15 zile, schimbat de două ori. Acest timp are scopul de a extrage substanțele mielinice fixate de formol; 3) includere în celoidină; 4) secțiunile se țin în alcool 80°, timp de 12—24 de ore, la 37°; 5) colorare în sol. tionină 1%; 6) diferențiere obişnuită în Gothard; 7) dacă această diferențiere nu reuşeşte să scoată un fond clar, se hidratează din nou secțiunea şi se face o nouă diferențiere în alcool 70° cu adaus de I—II picături acid clorhidric; 8) deshidratare în alcool absolut; 9) clarificare în xilen, montare în balsam.

Rezultate. Preparatele reuşesc în genere destul de bine, însă se decolorează, chiar dacă sunt păstrate la întuneric.

§ 1078. — Dahlen recomandă pentru secțiunile de parafină sau celoidină, din piesele fixate în formol, următoarele modificări ale tehnicii Nissl: *a)* în lichidul Gothard, uleiul de cajeput este înlocuit cu eucaliptol; *b)* după diferențiere, secțiunea se hidratează pentru a suferi o trecere rapidă (câteva secunde) în sol. 1% acid acetic, după care urmează spălare în apă distilată; *c)* deshidratare rapidă in alcool 95° şi în alcool absolut 1—3 minute, urmată de o baie de xilen de zece minute. Montare în balsam de Canada neutru.

Rezultate. Aspectul granulelor Nissl este acelaş ca pe piesele fixae în alcool fiind însă mai colorat fondul preparatului.

§ 1079. — Spielmeyer, pentru piesele fixate în alcool şi incluse în celoidină, recomandă diferențierea în: ulei de anilină 10 cc + alcool 96° 90 cc, amestec preparat proaspăt (formulă recomandată şi în metoda originală Nissl). Secțiunile sunt trecute pe lamă, uscate cu hârtie de filtru şi clarificate cu ulei de cajeput. Se scurge acesta, se şterge cu hârtie de filtru şi se varsă de mai multe ori în xilen peste secțiune, montându-se apoi în balsam de Canada.

§ 1080. — Se pot obține diferențieri lente numai cu alcool 95°, renunțând la diferențiatorii puternici, ca lichidul lui Gothard sau uleiul de anilină. Contrastul dintre substanța cromatofilă şi restul preparatului nu este atât de mare ca în tehnicile precedente, dar preparatele nu se mai decolorează.

§ 1081. — O altă tehnică pentru piesele provenite dela prosecturi, pe piese de 2—6 cm, este următoarea: 1) fixarea în alcool etilic 95° 100 cc, acid tricloracetic 1,5 cc, sublimat 3 g. Fixarea durează 2—10 zile şi lichidul fixator se reînoieşte la 2 zile, se decantează fixatorul şi se înlocueşte cu alcool 95°; 2) includere la parafină; 3) colorarea secțiunilor în sol. albastru de toluidină 0,1% (colorantul preparat la cald). Timpul colorării este de 15—18 ore. Se decantează colorantul, se clătesc secțiunile cu apă distilată pentru îndepărtarea restului de colorant şi se umple vasul de colorat cu sol. carbonat de litiu, unde secțiunile stau 2 ore. Soluția de carbonat de litiu se prepară din sol. saturată carbonat de litiu 100 cc, apă distilată 900 cc. Soluția saturată se prepară din 5 g carbonat de litiu la 1000 cc apă distilată la fierbere. Se filtrează la răcire; 4) spălarea secțiunilor în apă distilată (câteva minute); 5) diferențiere în alcool 70° 5—30 de minute, apoi alcool 95° 5—15 minute; 6) deshidratare alcool absolut; clarificare în xilen. Montare în balsam.

Rezultate şi interpretare. Fixatorul complex aduce o bună insolubilitate a granulaţiilor. Coloraţia prelungită şi metacromazia date de carbonatul de litiu sunt utile. Diferențierea lentă asigură contrastul. Aciditatea fixatorului face să crească mărimea granulaţiilor. Se indică în acest scop adăugare de acid acetic la fixatorul Zenker.

§ 1082. — Pentru piesele mai mici, King dă o metodă mai rapidă şi anume: 1) fixare în alcool 95°, cu 10 % formol, timp de 1—2 zile; 2) includere în parafină ; 3) secțiunile sunt colorate în albastru de toluidină, albastru de metilen sau violet de crezil, soluție 0,1—1%, sau soluție tionină, în apă fenolată 1%. Timpul de colorare durează 6—12 ore; 4) spălare în apă; 5) deshidratare—diferențiere în alcool de 80°, 95° şi alcool absolut; 6) clarificare în xilen. Montare în balsam.

§ 1083. — Roşul neutru a fost deasemenea recomandat pentru punerea în evidență a granulaţiilor Nissl, mai ales pe secțiuni pe care mai sunt practicate şi alte tehnici, pentru evidențierea altor detalii structurale. *a)* Pe piese fixate în alcool sau formol şi după impregnare Cajal sau Bielschowscky se poate supracolora cu soluția roşu neutru 1% (maturată 1—4 ani). Se diluează colorantul 1/4—1/10. Soluția poate fi reîntrebuințată. Secțiuni groase. Clarificare cu xilen. *b)* Pe piese fixate în Bouin sau pe secțiuni colorate cu Weigert-Pal putem utiliza soluția

roşu neutru nematurat, care are următoarea formulă: roşu neutru 1 g, apă distilată 500 cc, sol. 1% acid acetic 2 cc. Durata colorării este de 10—20 de minute. Spălare rapidă în apă distilată. Diferenţiere în alcool 95° şi în alcool absolut. Clarificare în xilen. Montare în balsam.

Rezultate. Granulaţiile Nissl sunt colorate în roşu.

§ 1084. — Este recunoscută de toţi cercetătorii importanţa substanţei cromatofile pentru studierea stărilor funcţionale normale şi patologice ale neuronilor. S'a încercat o analiză tinctorială a componenţilor histologici din granulaţiile Nissl. In acestea ar intra trei substanţe: o substanţă bazofilă cromatinică, o proteină bazofilă şi o proteină acidofilă. Prin colorantul galocianină se colorează proteina bazofilă şi substanţa cromatinică, iar proteina acidofilă poate fi colorată cu galamină. Pentru coloraţia cu galocianină, fragmentele se fixează în formol, alcool, formol-alcool sau Zenker. Includere în parafină. Colorantul se compune din sol. 5 ‰ alaun de crom 100 cc, galocianină 0,15 g. Se disolvă la cald, fierbând uşor 15—25', agitând mereu. Se răceşte gradat. Se filtrează. Coloraţie în baie. Timpul de colorare este de 24×48 de ore. Spălare în apă distilată, deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Corpii tigroizi şi cromatina sunt colorați în albastru-închis, putându-se observa bine schimbările patologice ale substanţei cromatofile.

METODE PENTRU NEUROFIBRILE

§ 1085. — Neurofibrilele constitue o caracteristică de mare importanţă a neuronului şi în cursul timpului s'au recomandat numeroase tehnici pentru a le studia. Nu sunt însă încheiate discuţiile asupra naturii reale a acestui detaliu structural, dacă are o existenţă adevărată sau dacă nu cumva este un produs apărut prin acţiunea reactivilor chimici, utilizaţi de tehnică. Aparatul neurofibrilar nu a putut fi găsit în celulele nervoase din culturi decât de puţini cercetători; prin microdisecţie nu a putut fi evidenţiat; totuşi, faptul că reuşim a urmări celulele nervoase şi mai ales prelungirile lor prin punerea în evidenţă tocmai a neurofibrilelor face ca să le acordăm o reală şi importantă existenţă. In bună parte, progresele realizate de neurohistologia de azi sunt datorite tehnicilor neurofibrilare şi în special impregnării acestor fibrile cu săruri metalice.

§ 1086. — **Metoda lui Bethe** (1890, 1893), pentru evidenţierea prin molibden a neurofibrilelor din sistemul nervos central, este astăzi din domeniul istoriei. Se bazează pe afinitatea specială a neurofibrilelor de a reţine în mod deosebit sărurile de molibden, care, lucrând ca mordanţi, fac să se coloreze intens cu coloranţii bazici, mai ales cu albastrul de toluidină. Piesele, după ce suferă acţiunea molibdenului, sunt incluzionate în parafină şi secţiunile sunt colorate. Metoda este foarte minu-

ţioasă, reuşita colorării depinzând de mulţi factori, ceeace îi dădea nesiguranţă. Metoda aceasta a servit pentru punerea în evidenţă a detaliilor structurale neuronale, în primii timpi ai neurohistologiei; astăzi nu mai este întrebuinţată.

§ 1087. — Pe acelaş principiu sunt bazate metodele de colorare tip Donnagio, utilizate de unele şcoli neurohistologice. Dăm una din aceste tehnici: 1) fixare de fragmente mici din sistemul nervos central în piridină, timp de 5—6 zile; 2) spălare în apă 24 de ore; 3) trecere în sol. 4% molibdat de amoniu 50 cc. Acid clorhidric 4 picături. In această soluţie secţiunile stau 24 de ore; 4) spălare rapid în apă, deshidratare, clarificare, includere în parafină ; 5) secţiuni de 4—7μ, lipite cu albumină. Deparafinare, xilen, alcool şi trecere scurtă (un minut) în apă (sărurile de molibden sunt solubile în apă; deaceea trecerile trebue să fie scurte); 6) colorare în sol. tionină 1/10 000. Se consideră terminată colorarea când controlul microscopic găseşte nucleii decoloraţi, care la început prind culoarea. Rămân colorate numai neurofibrilele; 7) spălare; refixare în molibdat de amoniu; 8) deshidratare. Clarificare Nissl. Montare în balsam.

Rezultate. Neurofibrilele, din celule şi expansiuni, sunt colorate în albastru-violet, pe un fond foarte slab colorat.

Impregnările metalice

§ 1088. — Neurofibrilele din celule şi prelungiri se studiază astăzi mai ales prin ajutorul impregnărilor, fie că este vorba de sistemul nervos central, fie că cercetăm sistemul nervos periferic sau terminaţiile nervoase din profunzimea organelor.

§ 1089. — **Mecanismul impregnărilor şi conduita cercetătorului.** Impregnarea constă în acţiunea tehnică prin care facem ca o sare metalică să se reducă în pulbere fină la nivelul elementelor structurale celulare sau tisulare. Sărurile cele mai utilizate sunt cele de argint, aur, osmiu, mercur. Reducerea se face sub formă de pulbere fină, sau granulară, de dimensiuni variabile, după sarea întrebuinţată şi după metoda urmată. Depunerea granulelor se face după afinitatea detaliului structural pentru aceste granule; ea trebue să fie selectivă şi nu este o simplă precipitare de sare metalică. In cazul impregnărilor argentice ale neurofibrilelor, depunerea granulelor într'un anumit fel dă aspectul bine cunoscut al neurofibrilelor, care ar reprezenta orientarea liniară a micelelor (Weber). Apariţia detaliilor vizibile prin impregnare este în raport cu mărimea granulelor argentice. Dacă aceste granule au cel puţin 120 mμ, filamentele apar cu aspect brun-negru; dacă sunt sub aceste dimensiuni, detaliile apar brune-deschis sau gălbui, ajungând până la dispariţia lor din câmpul de examen al obiectivelor noastre. Suntem obişnuiţi să vorbim de argentofilia de diferite grade a detaliilor structurale

atunci când în realitate este vorba de mărimea granulelor argentice. Pe acest principiu stă cercetarea aparatelor metaterminale din studiul terminațiilor nervoase, ca ultime detalii evidente în perparatele impregnate. Reducerea se poate efectua direct pe elementele histologice, având atunci o impregnare pozitivă, sau în spațiile capilare dintre fibrile, sau celule, având o impregnare negativă. Reducerea se produce sub acțiunea mai multor factori ca: 1) acțiunea reducătoare a țesuturilor; 2) acțiunea unor substanțe chimice: formolul, pirogalolul, hidrochinona, alcoolul, zaharurile, sau în fine 3) acțiunea agenților fizici, ca lumina soarelui. Pentru a avea rezultate satisfăcătoare, trebue ca reducerea să se facă în momentul dorit și cu intensitatea bine gradată, adică să o putem conduce prin tehnica noastră.

§ 1090. — Pentru reușita impregnării: 1. Vor fi întrebuințate vase de sticlă, de preferat Pyrex, sau de porțelan, care să fie destinate numai impregnărilor. Ele vor fi foarte bine curățite cu săpun și apă curgătoare, apoi apă distilată, degresate cu alcool și eter, eventual flambate. In cele din urmă vor fi din nou spălate cu apă distilată. Aceste măsuri sunt luate pentru a nu rămânea pe vase resturi organice, ceeace ar produce precipitarea soluțiilor metalice. Unele cristalizoare vor fi colorate și prevăzute cu capac.

2. Vom utiliza produse chimice pure (substanțe « pro analysi »). Astfel, nitratul de argint, carbonatul de sodiu, carbonatul de litiu, piridina, amoniacul, trebue să îndeplinească aceste condiții. De exemplu, amoniacul trebue să aibă o anumită densitate (22 sau 28° Bé), căci altfel nu are concentrația dorită. Formolul va fi special pentru impregnări, neutralizându-l prin carbonat de calciu sau magneziu. Punem din aceste substanțe o cantitate suficientă în flaconul cu formol, în așa fel ca să facă un depozit de 2—3 cm la fundul vasului. Va fi păstrat în sticlă cu dop de plută. Deasemenea, acidul bromhidric, utilizat în impregnările de nevroglie, va fi chimic pur, în flacoane originale.

3. Soluțiile necesare impregnărilor vor fi făcute în flacoane foarte curate, a căror pregătire s'a făcut ca și a godeurilor. Pentru facerea soluțiilor se va utiliza apa bidistilată. Flacoanele vor avea dopuri șlefuite și vor fi de culoare închisă pentru unele soluții.

4. La manipularea secțiunilor se vor întrebuința ace de sticlă, care vor fi șterse cu alcool și flambate, pentru a nu avea urme de substanțe organice pe ele. Vom avea suficiente ace de sticlă în timpul impregnării, pentru a nu trece picături de lichid dintr'un vas în altul.

5. Cantitatea de lichid pentru impregnare trebue să fie destul de mare pentru ca secțiunile să poată pluti în baia impregnantă sau cu reactiv. Deseori vom mișca vasul, într'o direcție și alta, pentru a face un contact mai larg al piesei sau secțiunii cu lichidul din vas.

§ 1091. — Timpii impregnării. Operația impregnării poate fi oarecum schematizată, ea cuprinzând o serie de timpi de tehnică ce se succed într'o ordine precisă. Se pretează astfel la considerații generale. Fixarea

pieselor constitue timpul de pregătire a impregnării, timp care are o importanță foarte mare, după cum s'a accentuat de diferiți cercetători în ultima vreme. S'a insistat mai ales asupra rolului fixatorului în transformarea coloizilor aflați în stare de sol luând aspectul de bastonașe, care la rândul lor vor da neurofibrilele. Fixatorii mai joacă și rolul de mordanți pentru sărurile argentice. Pentru impregnări au o importanță deosebită ca fixatori: formolul, alcoolul, sărurile de brom, hidratul de cloral, somnifenul. Mischkolczy, încă din 1924, recomandă o degresare a țesuturilor pentru a pregăti o bună impregnare a pieselor bogate în fibre mielinice. In acelaș mod lucrează amestecul de alcool propilic, acetonă și dioxan căruia i se adaugă apoi nitrat de cobalt, acesta din urmă producând o egalizare a impregnării. Inseși produsele de disolvare a lipoizilor și grăsimilor, sub acțiunea fixatorilor, ar ajuta la rândul lor impregnarea, și deaceea Weber (1942) recomandă pentru o impregnare reușită a fibrelor fără mielină să se facă fixarea pieselor în formol diluat într'un mediu în care se găsesc disolvate substanțe lipidice provenite din mielina centrilor nervoși. Piridina se întrebuințează numai ca prefixator, precedând fixarea în alcool, sau ca un corectiv al pieselor fixate de mult timp în formol. Alcoolul amoniacal a fost întrebuințat încă din timpul lui Bethe, dar este întrebuințat și azi în metoda Cajal originală, sau în derivatele ei.

§ 1092. — Pentru piesele nervoase cuprinse în carapace osoase se recomandă fixatori care să conțină și acid azotic, ca decalcificant. Aciditatea acestuia nu vatămă fixării și nici impregnării. In unele formule de fixatori, cum vom vedea, intră deseori acidul acetic sau tricloracetic, clorhidric sau bromhidric. Formulele precise ale fixatorilor și indicațiile lor vor fi date cu ocazia fiecărei metode de impregnare.

§ 1093. — Deformolizarea constitue un timp de tehnică aproape constant în pregătirea impregnării, socotind că o piesă sau secțiune imbibată cu formol când este introdusă în baia argentică produce o reducere bruscă a argintului din soluție, formolul fiind un reductor puternic. Deaceea se recomandă ca piesa sau secțiunea să fie spălată bogat în apă distilată, schimbată de mai multe ori. Se adaugă uneori amoniac în apă, pentru a da elasticitate secțiunilor, care devin rigide printr'o prelungită fixare în formol. Amoniacul este scos, la rândul său, printr'o spălare în apă distilată.

§ 1094. — Impregnarea poate fi simplă sau dublă, adică piesele sau secțiunile suferă acțiunea unei singure băi argentice (de obicei de nitrat de argint), cum ar fi în metoda Cajal, sau se adaugă o a doua impregnare într'un argint sensibilizat, cum ar fi în complexul argento-amoniacal din metoda Bielschowsky. Soluția de impregnare simplă se prepară în condițiile de puritate amintită, în concentrări de 1—20%. De obicei se fac diluțiile necesare la întrebuințare dintr'o soluție-mamă de 20%. Soluția obținută trebue să fie perfect limpede.

§ 1095. — Prepararea complexului argento-amoniacal utilizat în metoda Bielschowsky-Fontana se face după reguli precise, care trebue respectate. Sunt necesare următoarele soluții: *a)* soluție de nitrat de argint 10—20% în apă distilată; *b)* soluție de hidrat de sodiu 40% (în apă distilată) (hidrat de sodiu purissim, pro analysi); *c)* amoniac pur, pro analysi, cu greutatea specifică 0,875—0,925. *Modul de preparare.* Intr'un mic vas Erlenmeyer, sau o mensură foarte curată, se pun 5—10 cc din sol. *a*, adăugându-se 5 picături din soluția *b* (de obicei se adaugă 1 pic. soluție hidrat de sodiu la 1 cc soluție nitrat de argint 10%). Se produce un precipitat de oxid de argint, care este pulverizat prin agitarea flaconului. Acest precipitat poate fi spălat de mai multe ori cu apă distilată, prin decantare, sau fără spălare putem proceda la disolvarea sa prin adăugare de picături de amoniac, agitând mereu flaconul pentru ușurarea disolvării. Atunci când precipitatul este aproape complect disolvat, se adaugă apă distilată pentru a complecta la 25 cc de soluție. Negreșit se va adăuga mai multă apă dacă lucrăm cu precipitatul spălat decât dacă nu a fost spălat (apa din soluția argentică). Amestecul acesta se poate păstra câteva zile la întuneric și ferit de praf. Nu se păstrează precipitatul argento-amoniacal sub formă de pulbere, căci este explozibil. Complexul amoniaco-argentic se poate prepara și fără adaus de hidrat de sodiu, numai din amoniac și soluția de nitrat de argint, după cum vom vedea la metoda Bielschowsky-Gros și altele. Prepararea carbonatului de argint va fi dată la metodele pentru nevroglie.

§ 1096. — Reducerea sărurilor de argint. Acest timp se realizează fie pe blocuri, fie pe secțiuni, după metoda utilizată. Se întrebuințează ca reductor fie formolul simplu (aldehidele fiind reductoare puternice ale sărurilor argentice), fie formolul în amestec cu pirogalolul, ca în reductorul Cajal. Reducerea trebue făcută, de cele mai multe ori, la întuneric.

§ 1097. — Se poate realiza și o *diferențiere* a impregnării, reușind a scoate excesul de impregnare, când aceasta a fost prea puternică. Se tratează pentru aceasta secțiunile cu sol. cianură de potasiu. Fondul devine mai clar și detaliul impregnat apare mai evident. Se mai recomandă ca secțiunile supraimpregnate să fie trecute pentru 2—10 secunde într'o soluție de cianură de potasiu 0,5—1‰. Se poate utiliza în acelaș scop și o soluție proaspătă de hipermanganat de potasiu 1—2,5%. Secțiunile supraimpregnate pot fi complect decolorate printr'o tratare de 1—12 ore în soluție 1% cianură de potasiu. După aceasta se spală îndelung și pot fi puse din nou la impregnare. Bielschowsky recomandă amestecul: sol. 1% fericianură de potasiu 10 cc, sol. 1% nitrat de uran 10 cc, apă distilată 100 cc. Este întrebuințat după fixarea impregnării, dacă aceasta este prea intensă, sau se recomandă adăugarea de câteva picături din soluția de fericianură de potasiu 20%, în soluția de tiosulfat de sodiu, întrebuințată ca fixatoare.

§ 1098. — Spălarea fragmentelor (blocurilor) sau secțiunilor înainte de începerea impregnării, între cele două impregnări, sau înainte de reducere, constitue momente importante în cursul impregnării. Aceste spălări, care urmăresc împiedicarea formării de precipitate masive la suprafața pieselor sau secțiunilor, trebue făcute cât mai repede — câteva secunde. Unele tehnici renunță la unele dintre ele, de teamă de a nu împiedica impregnarea.

§ 1099. — Virarea este operația prin care adăugăm impregnării argentice o a doua impregnare rapidă cu clorură de aur, în soluție 1/500, pentru a intensifica unele detalii structurale impregnate și a mări astfel contrastul, îndepărtând unele depuneri făcute interfibrilar. Acest timp se execută totdeauna pe secțiuni, chiar și atunci când impregnarea s'a practicat pe bloc. Nu este o operație obligatorie. Sevirscaia și Promaslov (1950) au recomandat recent utilizarea compușilor sulfurați în locul clorurii de aur, după impregnarea cu argint a preparatelor de sistem nervos. Se formează o sulfură de argint, de culoare neagră, care intensifică impregnarea, producând acelaș efect ca și virarea cu aur, însă cu un produs economic. *Tehnica.* După impregnare, secțiunile sunt trecute în apă amoniacală (1 : 2) timp de 30'. Spălare în apă distilată, schimbată de câteva ori. Trecere în apă acidulată cu acid acetic, timp de 30 de minute. Tratare cu soluție de sulfură de sodiu 25% timp de 10—15 minute. Spălare în apă distilată. Colorare cu hematoxilină. Deshidratare. Montare în balsam.

§ 1100. — Fixarea impregnării se face, ca și în tehnica fotografică, din care de altfel s'au inspirat mult tehnicile de impregnare, utilizând o soluție de tiosulfat de sodiu 5%. Acest fixator poate fi mai complex în compunerea sa decât în formula dată de Cajal. Astfel se poate întrebuința următoarea formulă: tiosulfat de sodiu 5 g, soluție concentrată de bisulfit de sodiu 5 cc, alcool 95° 30 cc, apă distilată 70 cc. Fixarea se face în 10—30 de minute, în care timp secțiunile iau o culoare spre violet. După fixare se face spălarea secțiunilor, care trebue să fie totdeauna prelungită, 1/2—12 ore, pentru a fi îndepărtate precipitatele neplăcute.

Rezultatele impregnărilor vor fi văzute odată cu studiul fiecărei metode.

§ 1101. — Metodele de impregnare tip Ramon y Cajal. Metoda inițială indicată de Cajal a fost specială pentru facerea unei impregnări pe bloc; mai apoi s'au făcut adaptări pentru aplicarea ei pe secțiuni, după înghețare, sau după includere în celoidină sau parafină. In numeroasele sale lucrări, Cajal a recomandat 6 metode de aplicare a principiului impregnării ce-i poartă numele, fiecare din aceste metode cuprinzând o serie de variante. Toate aceste modificări se raportează la compunerea fixatorului, la introducerea unui prefixator sau la compunerea lichidului de impregnare. Aceste modificări sunt în raport cu piesele de cercetare (piese embrionare, animale tinere sau adulte), cu felul recoltării și mai ales cu detaliul urmărit. Ca un exemplu citâm faptul că pentru studiul

cerebelului se recomandă 6 tehnici, după cum se cercetează arborizațiile pericelulare ale celulelor lui Purkinje, fibrele agățătoare, stratul granulos, etc. Pentru asemenea indicații ultraspeciale se pot căuta tehnicile mai desvoltate sau publicațiile speciale. Vom reda aici numai tehnica Cajal tip și un număr de modificări ale ei. Principiul metodei este aplicarea developării, ca în fotografie, a pieselor sau secțiunilor tratate cu nitrat de argint. Când piesele au oarecare dimensiuni, pătrunderea soluției de nitrat de argint este dificilă, cere timp lung și temperatura de 37°. Numai zona mijlocie a piesei prezintă o pătrundere optimă, zonele centrale nu sunt impregnate. In metodele inițiale, când piesele nu se fixau în prealabil, acest defect era și mai mare.

§ 1102. — **Metoda Cajal** pentru sistemul nervos central, dar care poate fi aplicată, cu oarecare modificări, și pentru sistemul nervos periferic (metoda a III-a). Necesită următoarele soluții: *a)* alcool 96°, *b)* amoniac pur, *c)* sol. nitrat de argint 3%, *d)* amestecul format din: pirogalol 1 g, formol 5 cc, apă distilată 100 cc, *e)* sol. clorură de aur 1%.

Tehnica. 1) Fixare de fragmente mici în amestecul de: alcool 96° 50 cc, amoniac pur I—XII picături. Cantitatea de amoniac variază după organul studiat; pentru măduvă: 8—12 picături, pentru cerebel 4 picături, pentru creier 1—3 picături; pentru sistemul nervos periferic 2—3 picături. Durata fixării este de 24—48 de ore; 2) spălare în apă distilată, până ce piesele cad la fundul vasului; 3) trecere în soluția (*c*) la temperatura de 37°, timp de 5—6 zile, în cristalizor colorat, cu capac. Se schimbă soluția după 24 de ore; 4) spălare rapidă în apă distilată; 5) reducere în amestecul (*d*) la întuneric, timp de 24—36 de ore, sau în amestecul: sulfit de sodiu 0,50 g, pirogalol 2 g, formol 5 cc, apă distilată 100 cc; 6) spălare în apă distilată; 7) includere în celoidină sau parafină cât mai rapidă; 8) secțiunile la parafină, de 10—15 μ, lipite pe lame cu albumină; 9) după deparafinare, virare pe lame în soluție de clorură de aur 1/500 (V picături din soluție 1% clorură de aur la 1 cc apă distilată), operație care nu este obligatorie. Timpul este de 2 minute. Se poate face înlocuirea virajului cu clorură de aur prin compușii sulfurați recomandați de Sevirscaia și Promaslov; 10) fixare în soluție de tiosulfat de sodiu 5—10% timp de 5—10 minute; 11) spălare prelungită în apă distilată sau de robinet timp de 30—120'; 12) deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Neurofibrilele din celule și fibrele nervoase sunt colorate în negru. Celulele cenușiu-închis. Cilindracșii nervilor periferici în negru. Fibrele gliale rămân necolorate.

1103. — Gurdjian (1927) dă o adaptare a metodei de impregnare Cajal, pentru piese de o anumită mărime (de exemplu un creier de șoarece alb, sau un peduncul cerebral de copil): 1) fixarea este făcută în 3 timpi: *a)* primul fixator: alcool 95° 100 părți, amoniac concentrat 1 parte. Fixarea durează 10—12 zile, schimbând zilnic fixatorul, în

primele zile; *b)* se șterg piesele și se trec în al doilea fixator format din: alcool 95° 100 cc, cloral hidrat 2—5 g. In acest fixator piesele stau 3—5 zile; *c)* clătire în apă distilată, pentru a fi trecut din nou în amestecul: alcool amoniacal, formula obișnuită, schimbat zilnic, timp de 2—3 zile; 2) se șterg piesele pe hârtie de filtru și se trec în soluție nitrat de argint 0,75% la întuneric, la 30°; timpul de impregnare este de 2—4 săptămâni (schimbat de două ori pe săptămână); 3) reducere în amestecul: pirogalol 5 g, formol 5 cc, apă distilată 100 cc. In reductor stau timp de 7—10 zile; 4) spălare, deshidratare, includere celoidină sau parafină. De remarcat durata prelungită a timpului de impregnare și mai ales fixarea complexă.

Rezultate. Pătrunderea impregnării mai adânc dă rezultate mai constante.

§ 1104. — S'a propus și o adaptare a metodei Cajal pentru secțiuni la ghiață din piese fixate în formol: 1) fixare în formol 12 %; 2) impregnare în soluția NO_3Ag 0,75% timp de câteva ore (până ce secțiunile devin brune); 3) reducere timp de câteva secunde în următorul amestec: soluție apoasă 0,5%, hidrochinonă 1 parte, soluție apoasă 0,75% NO_3Ag 1 parte, soluție apoasă 50% gumă arabică 1 parte; 4) fixare în soluție 10% tiosulfat de sodiu; 5) spălare. Trecere pe lamă. Uscare cu hârtie de filtru. Deshidratare în alcool 95° și absolut, xilen, balsam.

§ 1105. — Cajal (1925) a dat o adaptare a metodei inițiale pentru secțiuni la ghiață (pentru cerebel, organe de simț, etc.): 1) fixare în formol 20%, timp de cel puțin trei zile. (Pot fi utilizate și piese ce stau demult în fixator, chiar și un an); 2) secțiuni la ghiață, groase de 30—40 μ; 3) spălare în apă distilată timp de 5—6 minute; 4) trecere timp de 4—6 ore în soluție complexă preparată din: soluție 2% nitrat de argint 12 cc, alcool 77° 5—6 cc, piridină pură 7—10 picături. Operația se poate face la temperatura camerei sau, mai rapid, la termostat. Secțiunile iau o culoare brună; 5) trecere rapidă de 2—4 secunde în alcool absolut 10 cc. Se va trece numai câte o secțiune, pentru a nu se produce o extracție violentă a argintului; 6) reducere în amestecul: hidrochinonă 0,30 g, formol 20 cc, acetonă 15 cc, apă distilată 70 cc. Reducerea durează 1'—3 minute și se face în cristalizor colorat; 7) spălare în cantitate mare de apă; 8) virare în clorură de aur 1/500 (facultativ) timp de 15—30 de minute; 9) spălare în apă distilată; 10) fixare în tiosulfat de sodiu 10% timp de 30 de secunde; 11) spălare în apă: 12) deshidratare. Clarificare. Montare.

§ 1106. — Tehnică aplicabilă secțiunilor la parafină lipite pe lame, și care este puțin complicată. Este tot de tip Cajal: 1) fixare de piese mici în lichidul Carnoy; 2) includere parafină. Secțiuni lipite pe lamă. Deparafinare; 3) refixarea secțiunilor în amestecul următor timp de 12 ore: piridină 2 părți, glicerină 1 parte; 4) spălare în apă distilată; 5) trecere în soluție 10% nitrat de argint la termostat 37° timp de 12 ore; 6) spălare prin două treceri în apă distilată; 7) reducere în: formol

5 cc, pirogalol 0,50 g, apă distilată 100 cc. Reducerea durează 20 de minute; 8) spălare în apă; 9) virare în soluție 1/500 clorură de aur. Timpul de virare este de 5 minute; 10) reducerea aurului prin introducere în amestecul: formol neutru 1 cc, acid oxalic 2 g, apă distilată 100 cc. Reducerea durează 5 minute; 11) spălare în apă; 12) fixare în soluție 5% tiosulfat de sodiu timp de 5 minute; 13) spălare, deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Impregnarea este satisfăcătoare pentru piese mici. Are avantajul că se aplică pe secțiuni la parafină, din blocul respectiv putându-se face preparate și pentru alte cercetări.

§ 1107. — Metode de impregnare a neurofibrilelor după Bielschowsky. In acest grup de metode se face o dublă impregnare argentică, prima prin soluție simplă de nitrat de argint, a doua prin complexul de argint amoniacal. Metodele se pot aplica pe piese care au fost fixate de mult timp în formol, printr'o reîmprospătare a fixării sau prin trecerea prin piridină. Sunt metode care pot fi aplicate pe bloc, altele pe secțiuni (dela ghiață sau dela parafină, lipite pe lame); principiul general al metodei este același, variind numai unii din timpii tehnicii.

§ 1108. — Metoda Bielschowsky pe bloc: 1) fixare în formol 20% de piese proaspete și subțiri din creier (sau refixări scurte în formol de piese conservate mai demult, în formol), timp de 7 zile; 2) spălarea fragmentelor, în apă curgătoare, apoi spălare în apă distilată; 3) trecere în soluție 2% nitrat de argint, timp de 1—8 zile, la întuneric. Durata impregnării variază în funcție de mărimea pieselor; 4) spălare scurtă în apă distilată; 5) trecere în soluție de argint amoniacal timp de 1—6 ore. Se face o schimbare a soluției în cursul impregnării; 6) spălare în apă distilată; 7) reducere în formol 20%, timp de 12—24 de ore; 8) spălare în apă distilată. Deshidratare, includere rapidă în parafină; 9) secțiunile lipite pe lamă, se deparafinează și se trec în apă distilată; 10) virare în soluție de clorură de aur 1% 2—5 picături, apă distilată 10 cc, acid acetic glacial 2—3 picături; 11) spălare rapidă în apă, timp de 10—30 minute; 12) fixare în tiosulfat de sodiu 5%, timp de 1/2—1 minut; 13) spălare în apă de robinet, câteva ore; 14) deshidratare, clarificare, xilen fenolat 1/10, montare în balsam.

Rezultate. Impregnările reușite arată frumoasa structură neurofibrilară în negru-închis din celulele nervoase și prelungiri. Conjunctivul este slab colorat în galben-cenușiu.

§ 1109. — Impregnare pe bloc, cu fixare secundară. Se aplică pe piese fixate demult în formol, sau în care vrem să accentuăm argentofilia neurofibrilelor, pentru a contrasta cu restul țesuturilor care prind și ele argintul: 1) fixare de piese mici în soluție 10% formol timp de cel puțin 7 zile; 2) spălare în apă curgătoare 4—6 ore; 3) refixare în piridină pură, timp de 3—4 zile; 4) spălare în apă curgătoare, 12—24 de ore, apoi în apă distilată, 12—24 de ore; 5) trecere în soluție 3% nitrat de argint, la 36°, timp de 3—5 zile; 6) spălare rapidă (clătire) în apă dis-

tilată; 7) trecere în soluție de argint amoniacal (prepararea vezi § 1095), timp de 24 de ore. (Concentrare: se pleacă dela soluție 10% NO_3Ag 10 cc, se adaugă 5 picături soluție NaOH amoniac II picături în plus, după disolvarea precipitatului. Se diluează în 100 cc apă distilată); 8) spălare apă distilată, 15—60 de minute, schimbată de mai multe ori; 9) reducere în formol neutru 10%, timp de 10—12 ore; 10) spălare în apă; 11) deshidratare, includere în parafină; 12) aurire pe secțiuni. Ceilalți timpi ca în metodele precedente.

Rezultate. Această metodă permite utilizarea materialului vechi deja fixat. Glia și țesutul conjunctiv de obicei nu se impregnează. Se poate utiliza și pentru cercetarea terminațiilor nervoase. Structura fibrilară apare mai puțin accentuată ca în metoda originală.

Metode pentru impregnări pe secțiuni, tip Bielschowsky

§ 1110. — Secțiuni dela microtomul cu congelare. 1) Fixare în formol neutru 10—15%, timp de 3—6 săptămâni. Pentru sistemul nervos central aceasta este durata optimă; 2) dacă au stat un timp mai îndelungat în formol, vor fi trecute în piridină pură (24—48 de ore). Se spală apoi în apă distilată, îndelung, până ce dispare mirosul de piridină; 3) secțiuni la ghiață de 5—10 μ; 4) se primesc și se spală în apă distilată; 5) trecere în soluție 2% NO_3Ag, timp de 24—48 de ore, la întuneric, până ce secțiunile capătă culoarea brună-tabac; 6) spălare rapidă în apă distilată; 7) trecere în soluție de argint amoniacal, timp de 15—20 de minute. (Diverși cercetători modifică felul de pregătire a complexului argento-amoniacal, variind concentrația soluției de NO_3Ag dela plecare, precum și numărul de picături din soluție NaOH, ca și diluția finală. Aceasta arată că nu există o constanță în conținutul soluției în argint amoniacal. Este mult empirism în acest moment al tehnicii); 8) spălare rapidă în apă; 9) reducere timp de 5 minute în soluția 25%. Formol neutru (în apă de fântână). Se poate adăuga 1% citrat de sodiu pentru omogenizarea reducerii; 10) spălare în apă de robinet 15 minute; 11) virare în sol. clorură de aur, acidulată (acid acetic II—III picături la 10 cc) timp de 10—15 minute; 12) fixare, spălare, deshidratare, clarificare xilen fenolat, scurtă trecere xilen. Montare în balsam.

Rezultate. Neurofibrilele apar în negru pe fond clar. Cilindracșii evidenți. Coșulețele pericelulare, din creieruș, aparente. Pentru piese anatomopatologice se face supracolorare cu Sudan III, după virare.

§ 1111. — Pentru secțiuni lipite de lame. Metoda Rogers (1931) este o combinație a metodei Bielschowsky și Cajal. Are avantajul că pe secțiuni de același bloc de parafină se pot face mai multe tehnici (colorare și impregnare). *Tehnica*: 1) fixare în formol sau amestec

Bouin; 2) secțiunile la parafină, lipite pe lame, sunt refixate în alcool 95° 100 cc, amoniac 2 cc, timp de 12 ore; 3) spălare în alcool 80°; 4) trecere în sol 40% nitrat de argint la întuneric, timp de 20 de minute; 5) spălare rapidă (clătire) în apă distilată; 6) reducere în sol. formol 20%, timp de 2 — 5′ (se acoperă secțiunile cu această soluție); 7) se varsă formolul și se acoperă lamele cu soluție de argint amoniacal, atâta timp până ce secțiunile iau o culoare galbenă-brună (soluția argento-amoniacală se prepară pornind dela soluția 20% de NO_3Ag; nu se adaugă NaOH, ci numai amoniac cu picătura, până la disolvarea precipitatului ce se formează la început. Se adaugă un exces de 2 picături de amoniac. Se dublează soluția cu apă distilată); 8) secțiunile sunt virate timp de 10—15 minute în clorură de aur 0,10 g, apă distilată 30 cc, acid acetic glacial VI pic: 9) spălare în apă distilată; 10) fixare în sol. 5% tiosulfat de sodiu; 11) spălare prelungită în apă de robinet; 12) deshidratare, clarificare, montare.

Notă. Intre punctele 7 și 8 se poate face o nouă reducere în formol 20%.

Această tehnică, cu mici modificări, poate fi utilizată și pentru sistemul nervos periferic și terminațiile nervoase.

APARATUL RETICULAR INTERN GOLGI

§ 1112. — Se poate pune în evidență în celulele nervoase din sistemul nervos central sau în celulele ganglionare. Se cercetează pe piese cât mai proaspete, cel mult la 2 ore după moarte, sau experimental pe piese dela animale tinere (pisică, iepure, câine). Se recomandă a se aplica metoda Cajal (cu nitrat de uraniu sau metoda Da Fano cu nitrat de cobalt), sau metoda Colacev-Nasonov (cu impregnare osmică), tehnici utilizate de altfel și în citologia generală.

§ 1113. — Metoda Cajal, cu nitrat de uran: 1) fixare în amestecul format din: nitrat de uran 1—2 g, formol neutru 15 cc, apă distilată 85 cc. Timpul: pentru piese mici (2—2,5 mm) 8—24 de ore, iar pentru piese mai mari 24—36 de ore. Pentru ca aparatul Golgi să nu apară granular se adaugă în fixator alcool etilic (sau metilic) 30 cc. Pentru piese provenind dela animale adulte se va mări cantitatea de formol la 20%; 2) spălare (clătire) în apă distilată, mai puțin de un minut; 3) trecere în soluția 1,5% nitrat de argint, timp de 36—48 de ore. (Dacă piesele sunt mici de tot (de exemplu, ganglion spinal) se recomandă o soluție argentică de 0,75%); 4) spălare rapidă în apă; 5) reducere în amestecul format din: hidrochinonă 1—2 g, sulfit anhidru de sodiu 0,15 g, formol neutru 15 cc, apă distilată 85 cc (se suprimă sulfitul de sodiu când lucrăm piese dela adult). Timpul de fixare este de 8—12 ore; 6) spălare scurtă în apă curgătoare; 7) deshidratare rapidă, cel mult 1—2 ore (în alcool 90° și absolut); 8) includere în celoidină sau parafină; 9) secțiunile deparafinate pot fi colorate, pentru contrast, cu hematoxilină sau coloranți bazici de anilină.

Rezultate. Aparatul reticular Golgi apare colorat în negru-intens, pe un fond slab colorat.

§ 1114. — Metoda Da Fano, cu nitrat de cobalt. Se deosebește de precedenta prin înlocuirea nitratului de uran cu nitrat de cobalt, în compunerea lichidului fixator.

Ceilalți timpi ai impregnării sunt la fel.

§ 1115. — Metoda Colacev-Nasonov (tehnica Roschin 1951). 1) Fixare în lichidul lui Nasonov, sol. 3% bicromat de potasiu 2 părți, sol. 1% acid cromic 2 părți, sol. 2% acid osmic 1 parte. Fixarea se face la întuneric timp de 1—4 zile pe fragmente mici de 3 mm; 2) spălare apă de robinet 24 de ore; 3) impregnare în sol. acid osmic 1% (în cristalizor colorat) la 35°, timp de 3—6 zile. Dacă lichidul se înnegrește, se schimbă; 4) piesele înnegrite se trec în apă distilată. Pentru a se controla reușita impregnării se taie un mic fragment care se pune pe o lamă, într'o picătură de glicerină și se comprimă cu o lamelă, obținând o disociere a celulelor nervoase. Dacă la examenul microscopic găsim că aparatul reticular Golgi s'a evidențiat, se spală piesa în apă curgătoare 1 oră. Dacă rezultatul nu este satisfăcător se trec piesele din nou în sol. de acid osmic; 5) deshidratare rapidă. Includere parafină; 6) secțiuni subțiri: 2—5 μ.

Rezultate. Aparatul reticular intern Golgi apare negru-închis, pe un fond deschis. Pentru claritatea imaginii se pot colora nucleii cu safranină. Pe aceleași preparate se poate face supracolorare cu hematoxilină ferică, pentru evidențierea condriomului, având astfel pe același preparat ambele elemente structurale, sau se poate combina metoda Nasonov-Colacev cu metoda Benda.

§ 1116. — Trofospongiul Holmgren, considerat de unii autori ca o formațiune independentă de aparatul reticular Golgi, poate fi pus în evidență, în celulele nervoase, cu diferite metode de colorație din citologia generală. Astfel, Penfield recomandă hematoxilina ferică; Roschin (1951) recomandă colorația Mallory sau hematoxilină ferică, pe piese fixate în Zenker. Metoda Bensley (fixare cu acid osmic — bicromat și colorare cu fuxină acidă) deasemenea îl evidențiază.

CONDRIOMUL CELULEI NERVOASE

§ 1117. — Se aplică metodele citologiei generale. *a*) Metoda Regaud, cu hematoxilină ferică Heidenhain. 1) Se fixează fragmente mici în amestecul Regaud: sol. 3% bicarbonat de potasiu 80 părți, formol 20 părți. Durata fixării este de 1—3 zile, fiind urmată de supracromare în sol. 3% bicarbonat de potasiu, timp de 8—10 zile. Includere parafină; 2) după deparafinare, secțiunile sunt ținute în sol. alaun de fier

amoniacal 4% ca mordant, timp de 24 de ore; 3) după spălare rapidă în apă distilată, trecerea secțiunilor timp de 24 de ore în sol. alcool hematoxilină 10% 10 cc (maturată), apă distilată 90 cc (hematoxilină Heidenhain); 4) diferențiere sub controlul microscopului în sol. 1,5—2%, alaun de fier amonical; 5) se poate face o colorare de contrast cu sol. eozină 1‰.

Rezultate. Condriomul, mai des cu aspect mitocondrial, este colorat în negru. Celulele nervoase evidente, cromatina nucleară colorată.

§ 1118. — Metoda Champy-Kull: 1) fixare timp de 24 de ore în lichidul Champy format din sol. 3% bicromat de potasiu 7 cc, sol. 1% acid cromic 7 cc, sol. 2% acid osmic 4 cc; 2) spălare în apă distilată și trecere timp de 24 de ore în acid acetic pirolignos 10 cc, sol. 1% acid cromic 20 cc; 3) spălare în apă distilată, apoi mordansare în sol. 3% bicromat de potasiu, timp de 3 zile; 4) spălare în apă curgătoare, 24 de ore; 5) deshidratare, clarificare, includere parafină; 6) secțiunile lipite pe lamă cu albumină sunt colorate cu fuxină acidă, preparată după formula: fuxină acidă 10 g, apă anilinată 100 cc. Se filtrează direct pe lamă și se încălzește ușor la flacără, până încep a ieși vapori; 7) se lasă să se răcească 5—6 minute, se varsă colorantul și se spală repede cu apă distilată; 8) contracolorare cu sol. 0,5% albastru de toluidină, timp de 1—2 minute; 9) după spălare cu apă distilată se face începutul diferențierii în aurantia 0,50 g, alcool 70° 100 cc timp de 20—40 de secunde; 10) continuarea diferențierii în alcool 95°; 11) deshidratare rapidă, clarificare, xilen, montare în balsam.

Rezultate. Granulațiile condriomice sunt roșii, fondul celular galben-verzui și nucleu albaștri.

§ 1119. — Metoda Alzheimer colorează pe lângă neurosomi și tigroidul și fibrele gliale. 1) Fixare 24 de ore în sol. formol 10%, apoi refixare în amestecul Flemming, 8 zile; 2) includere parafină; 3) secțiunile se colorează, la 58°, în sol. apoasă concentrată de fuxină acidă, timp de 1 oră; 4) după spălare rapidă cu apă, diferențiere în sol. alcoolică acid picric 30 cc, apă distilată 60 cc, timp de 10 — 20 de secunde; 5) spălare rapidă în apă. Uscare cu hârtie de filtru. Deshidratare rapidă; clarificare în xilen, montare în balsam de Canada.

Rezultate. Neurosomii se colorează în roșu-viu; tigroidul în verde; fibrele gliale în roșu (Roschin, 1951).

TEHNICI PENTRU TECILE DE MIELINĂ

§ 1120. — Teaca de mielină constitue un detaliu structural de mare importanță în studiul sistemului nervos, fibrele cu mielină reprezentând o mare parte din substanța albă a sistemului nervos central. In procesele patologice, această teacă poate suferi importante alterări, astfel că cercetarea sa constitue un punct de seamă în tehnicile anatomo-

patologice. Prin tehnicile pentru tecile de mielină se pot studia traiectele fascicolelor nervoase pe piese normale sau după experimentări și mai ales pe piese dela embrioni, pentru urmărirea procesului de mielinizare.

Există tehnici pentru cercetarea mielinei normale și altele pentru mielina alterată. Tehnicile pentru sistemul nervos central pot fi aplicate și pentru cel periferic.

§ 1121. — Metoda Weigert pentru mielină normală (metoda originală).

Principiu. Piesele, fixate în formol sau nu, sunt trecute în băi complexe, cu baza de crom și cupru, unde stau timp îndelungat pentru a se forma o combinație stabilă cu mielină. Aceste lichide, numite mordante, pregătesc mielina pentru colorația cu hematoxilină. Se formează la nivelul tecilor cu mielină un lac cromic sau cromo-cupric, de hematoxilină, substanță chimică ce colorează mielina în negru-albăstruiu închis. Numai mielina normală se pune în evidență: dacă a fost alterată, prin procese patologice, nu se colorează. *Soluții necesare* : A. *Lichid fixator și conservator* : soluție 10% formol. B. *Primul mordant Weigert* : bicromat de potasiu 5 g, fluorocrom (CrF_3, $4H_2O$) 2 g, apă distilată (fiartă) 100 cc. C. *Al doilea mordant Weigert* (neurogliabeize); acetat de cupru 5 g, acid acetic 5 cc, fluorocrom 2,5 g, apă distilată 100 cc. Prepararea: se disolvă la cald fluorocrom (în lipsă poate fi înlocuit cu alaun de crom) în apă. Se stinge flacăra și se adaugă acidul acetic; apoi se adaugă în soluție, încetul cu încetul, acetatul de cupru pulverizat, amestecând continuu. La răcire, soluția trebue să rămână clară. D. *Colorantul* este cu bază de hematoxilină, maturată. Se poate întrebuința una din formulele: *a)* sol. 10% hematoxilină alcoolică 10 cc (maturată 6 luni), sol. saturată apoasă carbonat de litiu 1 cc, apă distilată 90 cc. Amestecul se face în momentul întrebuințării. *b)* Se va face un amestec, înainte de întrebuințare, din: 1) sol. clorură ferică oficinală 4 cc, apă distilată 96 cc; 2) sol. 10% hematoxină alcoolică 10 cc (maturată), alcool 96° 90 cc. E. *Diferențiatorul* : fericianură de potasiu 2,5 g, borax (biborat de sodiu) 2 g, apă distilată 100 cc.

§ 1122. — Tehnica colorării: 1) fixarea pieselor se va face în formol 10%. Se pot întrebuința și piese care nu au fost fixate, primul mordant servind și ca fixator; 2) se spală piesele după fixator, o noapte întreagă în apă de robinet; apoi sunt trecute în sol. B (primul mordant), timp de 7—10 zile (după mărimea pieselor); 3) spălare în apă; 4) trecere în soluția C (al doilea mordant), la 37°, timp de 1—2 zile. Unii cercetători rezervă acest mordant pentru a fi întrebuințat după includere pe secțiuni; 5) spălare, deshidratare, includere celoidină (piesele vor fi bine orientate, pentru a se putea cerceta mersul fascicolelor); 6) secțiuni, groase de 25—50 μ, se trec în soluția colorantă (*a*), timp de 20—24 de ore. Aici secțiunile iau o culoare albastră-neagră-închis. Dacă se utilizează colorantul (*b*) (hematoxilina Weigert), secțiunile sunt trecute mai întâi în alcool 70° și apoi în colorant unde stau 24

de ore; 7) spălare prelungită, în mai multe ape de robinet. Pot rămânea și 12 ore în apă; 8) trecere în lichidul diferențiator (E). Aici piesele își schimbă culoarea în așa fel că distincția dintre cele două substanțe ale piesei este foarte netă, rămânând colorată numai mielina. Timpul de colorare este de 20—60 de minute. Este necesar controlul microscopic asupra mersului diferențierii pentru cei neinițiați în această tehnică; 9) se oprește diferențierea prin spălare în apă. Spălare prelungită; se pot lăsa peste noapte în apă; 10) deshidratare, clarificare în xilen fenolat, apoi xilen pur. Montare în balsam de Canada. Este o metodă de lungă durată, în care răbdarea și îndemânarea cercetătorului sunt foarte necesare. Montarea secțiunilor trebue făcută cu multă grijă, mai ales trecerea pe lamă a preparatelor, care, fiind uneori destul de mari, se pot rupe. Numărul de picături de balsam ce se vor pune pe preparat trebue bine apreciat, pentru ca să nu pătrundă bule de aer între lamă și lamelă, în momentul montării.

Rezultate. Tecile de mielină sunt colorate în albastru-negru, contrastând cu fondul preparatului, care este galben-clar. Eritrocitele din vase și fibrele de fibrină sunt deasemenea negre.

§ 1123. — **Varianta Weigert-Pal** îngădue o mai bună diferențiere a fibrelor de mielină. Timpii metodei sunt următorii: 1) fixare în formol 10% timp de peste 7 zile; 2) trecerea pieselor în mordantul I al lui Weigert sau în soluție 3% bicromat de potasiu, timp de 1—4 săptămâni; 3) spălare în apă curgătoare; 4) deshidratare îngrijită. Includere celoidină; 5) secțiuni cu o grosime după scopul urmărit sau subțiri de 15—25 μ, sau groase de 25—75 μ.

Se pot colora în godeuri sau vase mai largi, sau se lipesc pe lame late, în filme; 6) secțiunile sau filmele sunt trecute timp de 1—2 ore în al doilea mordant format din sol. 0,5% acid cromic 100 cc, sol. 1% acid osmic 1 cc; în lipsă de acid osmic se poate prepara acest mordant în felul următor: sol. 3% bicromat de potasiu 100 cc, sol. 1% acid cromic 10 cc. In acest mordant secțiunile stau 24 de ore; 7) spălare rapidă în apă distilată, după care urmează colorarea în hematoxilină Culcițchi, preparată proaspăt după următoarea formulă: sol. 10% hematoxilină alcoolică 10 cc (maturată), acid acetic glacial 1 cc, apă distilată 100 cc. Colorarea durează timp de 12—24 de ore. Se poate face coloratia la cald (37°) sau la temperatura laboratorului (colorarea se poate face și în hematoxilină litinată, ca în metoda precedentă § 1121); 8) spălarea secțiunilor în apă, timp de 1 oră, până ce secțiunile încetează să mai piardă culoarea; 9) trecere în sol. hipermanganat de potasiu 0,50%, timp de 30 de secunde; 10) spălare în apă; 11) trecere în soluția Lustgarten, preparată prin amestecarea, în momentul întrebuințării, de părți egale din: *a)* sol. 1% sulfit de potasiu (soluții în apă); *b)* sol. 1% acid oxalic. Diferențierea se face cu atenție. Timpul aproximativ al diferențierii este de 3 minute. (Momentul precis al diferențierii optime îl stabilește după cercetarea contrastului dintre substanța albă cu mielină colorată în negru și substanța cenușie cu aspect clar. Se recomandă a se opri diferențierea înainte de a fi complectă, pentru ca după o spălare în apă să trecem secțiunile din nou în soluția de hipermanganat de potasiu și apoi iarăși în soluția Lustgarten. Aceste treceri succesive pot fi repetate. Secțiunile nu vor sta prea mult în soluția de hipermanganat de potasiu, căci în această baie își pierd conținutul de bicromat, de care ține colorarea mielinei. Deaceea se recomandă să se repete trecerile în cele două soluții, mai bine decât să fie lăsate secțiunile prea mult în vreuna); 12) când diferențierea este terminată (atunci când substanța cenușie este complect decolorată) se spală mult secțiunile în apă litinată (2 cc soluție saturată de carbonat de litiu la 1000 cc apă), sau în apă de conductă și apoi în apă distilată; 13) deshidratare, clarificare xilen-fenolat, apoi xilen pur. Montare în balsam de Canada. Se pot supracolora secțiunile, după terminarea diferențierii cu carmin alaunat sau cu coșenila.

Rezultate. Tecile de mielină apar colorate mai clar în albastru-închis, pe fondul decolorat, sau colorate în roșu-deschis prin colorarea de contrast.

§ 1124. — **Metoda Culcițchi.** Este foarte utilizată și dă rezultate bune. Atât colorantul, cât și diferențiatorul sunt deosebiți. 1) Fixare și mordansare în primul mordant Weigert (§ 1121); 2) includere în celoidină. Secțiunile de 20—25 μ sunt trecute în cel de al doilea mordant Weigert (§ 1121), timp de 30—60 de minute; 3) după spălare, colorare în: *Hematoxilină Culcițchi* preparată din *sol. A* : sol. saturată hematoxilină cristalizată în alcool absolut, maturată la soare 5—6 săptămâni. *Sol. B* : acid acetic glacial 20 cc, apă distilată 960 cc. Se amestecă 20 cc din sol. A cu 980 cc din sol. B. Timpul de colorare este de 24 de ore. Colorarea se face la temperatura laboratorului. Secțiunile devin negre ca asfaltul; 4) diferențiere, fără spălare, în diferențiatorul Culcițchi: sol. saturată de carbonat de litiu 100 cc, sol. 1% fericianură de potasiu 10 cc. Diferențiere lentă timp de 4—12 ore, sub controlul microscopului; 5) spălare, desihdratare, clarificare, montare în balsam. Desavantajul metodei constă în faptul că diferențierea trebue controlată un timp prea îndelungat. Diferențierea după metoda Weigert-Pal este mai ușor de făcut.

§ 1125. — Se pot realiza o serie întreagă de variante ale metodelor pentru tecile de mielină, utilizând coloranții puternici hematoxilinici (cum ar fi hematoxilina Heidenhain diluată, hematoxilina Weigert, etc.) și diverși diferențiatori: Weigert din tehnica originală, sau alaunul de fier amoniacal 2%, din tehnica Heidenhain, diferențiatorul Culcițchi, sau diferențiatorul Lustgarten. Din aceste combinații pot ieși tot atâtea variante.

§ 1126. — **Metoda rapidă pentru colorarea mielinei** este aplicabilă pe secțiuni la ghiață, parafină sau celoidină, din piese normale sau patologice. 1) Secțiunile sunt ținute în lichidul mordant: sol. 4% alaun

de fer şi amoniu [$FeNH_4(SO_4)_2$], timp de 15 minute; 2) spălare rapidă în alcool de 70°; 3) trecere în lichidul colorant şi diferenţiator: sol. 10% hematoxilină cristalizată 10 cc (în alcool absolut), maturată sau nu, apă distilată 88 cc, acid acetic glacial 2 cc. Timpul de colorare este de aproximativ 30—60 de minute. Se colorează la cald, la 55°, pe o platină încălzită. Se va cerceta momentul când începe diferenţierea, adică decolorarea substanţei cenuşii; 4) trecere în sol. saturată apoasă de carbonat de litiu, timp de 3 minute; 5) spălare rapidă în apă de robinet; 6) colorare de contrast (dacă este necesară); 7) deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate. Mielina apare colorată în albastru-închis, fondul slab colorat; nucleii apar clari.

§ 1127. — **Metoda Benda-Spielmeyer** nu este decât o adaptare, pentru colorarea mielinei, a metodei Regaud-Heidenhain, pentru condriom. Se aplică pe secţiuni la ghiaţă. 1) Piese fixate la formol, cel puţin 3 zile; 2) spălare în apă, 1 oră; 3) secţiuni la ghiaţă, grosimea 25—35 μ; 4) se trec secţiunile în sol. 2,5% alaun de fier amoniacal (cristale violete) timp de 6 ore sau chiar mai mult; 5) spălare în apă. Trecere în alcool 70° timp de 10 minute; 6) colorare timp de 1—2—12 ore în sol. alcoolică 10%, hematoxilină 5 cc, apă distilată 100 cc; 7) diferenţiere în sol. alaun de fier amoniacal dela punctul (4), eventual îndoit cu apă distilată. Control la microscop asupra mersului diferenţierii. Aceasta se întrerupe prin trecere în apă distilată; 8) spălare, deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Tecile de mielină sunt colorate în negru mai deschis. Se pot evidenţia şi alte detalii structurale în celule, cum ar fi condriomul, dacă diferenţierea este oprită într'un moment favorabil. Dacă colorarea tecilor de mielină nu este suficientă se poate relua colorarea şi repeta diferenţierea.

§ 1128. — Un alt procedeu al aceleiaşi metode este tot o coloraţie cu hematoxilină ferică a tecilor de mielină pe secţiuni din sistemul nervos central fixat în unul din fixatorii: formol, alcool, Bouin, Carnoy sau Flemming. 1) Includerea poate fi la parafină sau celoidină; 2) mordansare în sulfat de fier amoniacal [$FeNH_4(SO_4)_2$] soluţie 4%, timp de 2 ore; 3) colorare în sol. hematoxilină alcoolică 10% diluată cu apă la 1% timp de 3—8 ore; 4) diferenţiere în alaun de fier amoniacal, soluţie 2%, timp de câteva minute, şi după spălare în apă se complectează diferenţierea în sol. 0,5% acid clorhidric, până ce fondul se decolorează şi fibrele apar bine definite; 5) se spală secţiunile în apă de robinet, timp de o oră, pentru îndepărtarea acidului; 6) colorare de contrast cu sol. roşu neutru (maturată); 7) deshidratare cu atenţie, clarificare în xilen, montare în balsam.

Rezultate. Metoda are avantajul rapidităţii. Este uşor de realizat pe secţiuni din blocuri care mai pot servi şi pentru alte tehnici. Tecile de mielină sunt bine puse în evidenţă.

§ 1129. — **Metoda Marchi (1885) pentru mielină degenerată.** *Principiu.* Degenerarea care se produce în fibra mielinică, după secţionare sau rănire gravă, se semnalează prin modificări însemnate în starea chimică şi structurală (submicroscopică şi microscopică) a tecii de mielină. Această substanţă, în loc de a forma un strat continuu, ia aspectul de bule mici, de mărimi diverse, aşezate pe reţeaua de neurokeratină. Din punct de vedere chimic apare în cantităţi însemnate acidul oleic. Dacă o piesă, conţinând fibre normale şi patologice în ceeace priveşte mielina, este tratată cu un amestec de bicromat de potasiu şi acid osmic, se obţine o reacţie colorantă diferenţiată pe mielina normală şi patologică, şi anume mielina normală este oxidată repede de bicromatul de potasiu şi nu mai poate fi colorată de acidul osmic, în timp ce mielina degenerată, prin bogăţia sa în acid oleic, se colorează în negru, asupra ei lucrând acidul osmic. Pentru a avea rezultate pozitive, trebue să prindem un moment prielnic din procesul de degenerare al fibrelor şi anume: nu înainte de 8 zile şi nu după 3—4 luni dela începutul procesului patologic sau experimental. Punctul optim ar fi la 3—4 săptămâni dela începutul leziunii.

Tehnică. La recoltarea pieselor se va avea grijă să nu se producă striviri ale fragmentelor, deoarece prin aceste leziuni artificiale producem deasemenea o alterare a mielinei, ceeace ar da o coloraţie pozitivă. Deasemenea, mielina degenerată se poate deplasa prin manipulări prea grosolane. O fixare prea prelungită în formol poate aduce şi ea reacţii pozitive, prin precipitate de formol. 1) Fixarea fragmentelor subţiri se face în lichidul Müller sau în sol. 3% bicromat de potasiu. Timpul de fixaj este de cel puţin 8 zile, optim 25 de zile, nu mai mult însă de 35 de zile. Se va schimba fixatorul de mai multe ori în acest interval; 2) se micşorează fragmentele, rămânând groase de cel mult 2—3 mm şi se trec, fără spălare, în soluţia Marchi, proaspăt preparată după formula: sol. 3% bicromat de potasiu 2 părţi, sol. 1% acid osmic 1 parte. Secţiunile stau în soluţie un timp variabil, după felul şi mărimea pieselor (nervi periferici 8 zile; măduvă 12 zile; creier 20—30 de zile). Se păstrează în vase perfect închise. Se schimbă soluţia săptămânal; 3) Spălare în apă curgătoare, timp de 24—48 de ore; 4) deshidratare rapidă (la nevoie se poate întrebuinţa şi acetona). Includere rapidă în celoidină. Se recomandă mersul rapid al acestor operaţii de tehnică, pentru a nu se produce o disolvare a substanţelor colorate cu acidul osmic; 5) secţiuni de 20—50 μ. Deshidratare, clarifiere, montare în balsam. Se poate face şi o supracolorare cu safranină, amestec van Gieson sau fuxină fenolată.

Rezultate. Mielina degenerată se prezintă sub forma de suprafeţe sau puncte negre, pe un fond galben-brun, format din fascicolele de fibre nealterate, din celulele nervoase şi fibrele nevroglice. Trebue să fim atenţi la posibilitatea de a exista artefacte.

de fer şi amoniu [$FeNH_4(SO_4)_2$], timp de 15 minute; 2) spălare rapidă în alcool de 70°; 3) trecere în lichidul colorant şi diferenţiator: sol. 10% hematoxilină cristalizată 10 cc (în alcool absolut), maturată sau nu, apă distilată 88 cc, acid acetic glacial 2 cc. Timpul de colorare este de aproximativ 30—60 de minute. Se colorează la cald, la 55°, pe o platină încălzită. Se va cerceta momentul când începe diferenţierea, adică decolorarea substanţei cenuşii; 4) trecere în sol. saturată apoasă de carbonat de litiu, timp de 3 minute; 5) spălare rapidă în apă de robinet; 6) colorare de contrast (dacă este necesară); 7) deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate. Mielina apare colorată în albastru-închis, fondul slab colorat; nucleii apar clari.

§ 1127. — Metoda Benda-Spielmeyer nu este decât o adaptare, pentru colorarea mielinei, a metodei Regaud-Heidenhain, pentru condriom. Se aplică pe secţiuni la ghiaţă. 1) Piese fixate la formol, cel puţin 3 zile; 2) spălare în apă, 1 oră; 3) secţiuni la ghiaţă, grosimea 25—35 μ; 4) se trec secţiunile în sol. 2,5% alaun de fier amoniacal (cristale violete) timp de 6 ore sau chiar mai mult; 5) spălare în apă. Trecere în alcool 70° timp de 10 minute; 6) colorare timp de 1—2—12 ore în sol. alcoolică 10%, hematoxilină 5 cc, apă distilată 100 cc; 7) diferenţiere în sol. alaun de fier amoniacal dela punctul (4), eventual îndoit cu apă distilată. Control la microscop asupra mersului diferenţierii. Aceasta se întrerupe prin trecere în apă distilată; 8) spălare, deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Tecile de mielină sunt colorate în negru mai deschis. Se pot evidenţia şi alte detalii structurale în celule, cum ar fi condriomul, dacă diferenţierea este oprită într'un moment favorabil. Dacă colorarea tecilor de mielină nu este suficientă se poate relua colorarea şi repeta diferenţierea.

§ 1128. — Un alt procedeu al aceleiaşi metode este tot o coloraţie cu hematoxilină ferică a tecilor de mielină pe secţiuni din sistemul nervos central fixat în unul din fixatorii: formol, alcool, Bouin, Carnoy sau Flemming. 1) Includerea poate fi la parafină sau celoidină; 2) mordansare în sulfat de fier amoniacal [$FeNH_4(SO_4)_2$] soluţie 4%, timp de 2 ore; 3) colorare în sol. hematoxilină alcoolică 10% diluată cu apă la 1% timp de 3—8 ore; 4) diferenţiere în alaun de fier amoniacal, soluţie 2%, timp de câteva minute, şi după spălare în apă se complectează diferenţierea în sol. 0,5% acid clorhidric, până ce fondul se decolorează şi fibrele apar bine definite; 5) se spală secţiunile în apă de robinet, timp de o oră, pentru îndepărtarea acidului; 6) colorare de contrast cu sol. roşu neutru (maturată); 7) deshidratare cu atenţie, clarificare în xilen, montare în balsam.

Rezultate. Metoda are avantajul rapidităţii. Este uşor de realizat pe secţiuni din blocuri care mai pot servi şi pentru alte tehnici. Tecile de mielină sunt bine puse în evidenţă.

§ 1129. — Metoda Marchi (1885) pentru mielină degenerată. *Principiu.* Degenerarea care se produce în fibra mielinică, după secţionare sau rănire gravă, se semnalează prin modificări însemnate în starea chimică şi structurală (submicroscopică şi microscopică) a tecii de mielină. Această substanţă, în loc de a forma un strat continuu, ia aspectul de bule mici, de mărimi diverse, aşezate pe reţeaua de neurokeratină. Din punct de vedere chimic apare în cantităţi însemnate acidul oleic. Dacă o piesă, con inând fibre normale şi patologice în ceeace priveşte mielina, este tratată cu un amestec de bicromat de potasiu şi acid osmic, se obţine o reacţie colorantă diferenţiată pe mielina normală şi patologică, şi anume mielina normală este oxidată repede de bicromatul de potasiu şi nu mai poate fi colorată de acidul osmic, în timp ce mielina degenerată, prin bogăţia sa în acid oleic, se colorează în negru, asupra ei lucrând acidul osmic. Pentru a avea rezultate pozitive, trebue să prindem un moment prielnic din procesul de degenerare al fibrelor şi anume: nu înainte de 8 zile şi nu după 3—4 luni dela începutul procesului patologic sau experimental. Punctul optim ar fi la 3—4 săptămâni dela începutul leziunii.

Tehnică. La recoltarea pi eselor se va avea grijă să nu se producă striviri ale fragmentelor, deoarece prin aceste leziuni artificiale producem deasemenea o alterare a mielinei, ceeace ar da o colorație pozitivă. Deasemenea, mielina degenerată se poate deplasa prin manipulări prea grosolane. O fixare prea prelungită în formol poate aduce şi ea reacţii pozitive, prin precipitate de formol. 1) Fixarea fragmentelor subţiri se face în lichidul Mü ler sau în sol. 3% bicromat de potasiu. Timpul de fixaj este de cel puţin 8 zile, optim 25 de zile, nu mai mult însă de 35 de zile. Se va schimba fixatorul de mai multe ori în acest interval; 2) se micşorează fragmentele, rămânând groase de cel mult 2—3 mm şi se trec, fără spălare, în soluţia Marchi, proaspăt preparată după formula: sol. 3% bicromat de potasiu 2 părţi, sol. 1% acid osmic 1 parte. Secţiunile stau în soluţie un timp variabil, după felul şi mărimea pieselor (nervi periferici 8 zile; măduvă 12 zile; creier 20—30 de zile). Se păstrează în vase perfect închise. Se schimbă soluţia săptămânal; 3) Spălare în apă curgătoare, timp de 24—48 de ore; 4) deshidratare rapidă (la nevoie se poate întrebuinţa şi acetona). Includere rapidă în celoidină. Se recomandă mersul rapid al acestor operaţii de tehnică, pentru a nu se produce o disolvare a substanţelor colorate cu acidul osmic; 5) secţiuni de 20—50 μ. Deshidratare, clarifi are, montare în balsam. Se poate face şi o supracolorare cu safranină, amestec van Gieson sau fuxină fenolată.

Rezultate. Mielina degenerată se prezintă sub forma de suprafeţe sau puncte negre, pe un fond galben-brun, format din fascicolele de fibre nealterate, din celulele nervoase şi fibrele nevroglice. Trebue să fim atenţi la posibilitatea de a exista artefacte.

§ 1130. — Încă din primele timpuri ale neurohistologiei cercetătorii au întrevăzut existența, între celulele şi fibrele nervoase din sistemul nervos central, a altor elemente, care constituiau un țesut interstițial special, pe care Virchow l-a descris mai complect în 1846 şi l-a denumit nevroglie (1853). Acest țesut este constituit din celule şi formațiuni fibroase. Acestea din urmă au fost interpretate de autori, după tehnicile utilizate, sau ca formațiuni dependente de celule, sau complect independente, aparținând unei împâsliri fibrilare. Mai târziu s'a văzut că în acest grup general glial se găsesc mai multe feluri de elemente celulare, cu funcții şi înfățişări morfologice deosebite. Comportarea lor este variată sub influența factorilor patologici şi de aci şi marea lor importanță în anatomia patologică a sistemului nervos. In 1919 Hortega a descris un nou element celular în țesutul interstițial al creierului — microglia —, cu funcții şi morfologie distincte, căruia i se atribue şi o origină embrionară deosebită de tot restul țesutului nervos.

Structura țesutului interstițial din sistemul nervos central a preocupat mult pe histologi şi anatomopatologi, în toate timpurile, dar mai cu deosebire de când acțiunile chirurgicale şi-au întins domeniul şi asupra sistemului nervos central, făcând posibile intervenții pentru extirparea tumorilor cerebrale. De atunci cercetările de histologie asupra țesutului glial, din care pornesc multe formațiuni tumorale, s'au extins şi mai mult. Sforțările vechilor cercetători pentru a studia structura țesutului glial se pot măsura după marele număr de metode recomandate pentru evidențierea celulelor şi fibrelor nevroglice. Aceste metode, după tehnica vremii, evidențiau prin colorații țesutul glial. După mordansări speciale, se întrebuințau coloranți puternici bazici, după care se aplicau diferențiatori care lăsau colorate numai elementele gliale. Metodele sunt destul de capricioase, cer o îndemânare deosebită din partea cercetătorului şi deseori nu reuşesc. Nu au deci nici caracterul de precizie şi nici siguranța ce se cere unei cercetări ştiințifice. Metodele de impregnare metalică, introduse mai târziu şi care s'au perfecționat continuu, au adus un progres în cercetarea acestui domeniu; lor li se datoreşte claritatea orientării actuale în clasificarea țesutului glial şi grație lor s'au făcut progrese însemnate în studiul şi interpretarea tumorilor cerebrale.

Metodele de colorare a nevrogliei

§ 1131. — **Metoda Weigert** (1895) pune în evidență mai ales elementul fibrilar al țesutului nevroglic. Deoarece acest țesut are rolul de reparator în unele procese patologice (cicatrizare), apărând ca înlocuitor al elementelor nobile nervoase în altele, această metodă a fost

utilizată mai mult în cazurile anatomopatologice, până la introducerea metodelor de impregnare.

1. *Fixare şi mordansare. a)* Dacă lucrăm cu piese proaspete se pot face ambele operații odată, punând piesele în mordantul II Weigert, căruia i se adaugă 10% formol: fluorură de crom 2,50 g, acid acetic 5 g, acetat neutru de cupru 5 g, apă distilată 100 cc, formol 10 cc. Fixarea se face la temperatura laboratorului, timp de 8—10 zile. Se schimbă lichidul de câteva ori. Fragmentele nu vor depăşi 5 mm grosime. *b)* Dacă piesele au fost fixate mai înainte în formol, din care se pot face şi alte cercetări (mielină, corpi Nissl, etc.) se detaşează fragmente mici ce se pun în mordantul Weigert (formula de mai sus, fără formol).

2. *Spălare rapidă*, deshidratare, includere în celoidină sau parafină. Secțiuni de 10—15 μ. Se pot face şi secțiuni la ghiață.

3. *Pregătirea colorării.* Secțiunile lipite pe lamă şi deparafinate (sau secțiunile dela celoidină sau ghiață) se trec în sol. 0,33% hipermanganat de potasiu timp de 10 minute. Spălare rapidă în două vase cu apă distilată şi trecere în reductorul format din sol. *A* : cromogen 10 g, acid formic 10 cc (greut. spec. 1,20), apă distilată 100 cc. Sol. *B* : sulfit neutru de sodiu 10 g, apă distilată 100 cc. Se amestecă 90 cc din sol. *A* cu 10 cc din sol. *B*. Reducerea durează 2—4 ore. Se filtrează.

4. *Colorarea* (se face după tehnica uşor modificată, pentru fibrină). Prepararea colorantului: *a)* soluție de violet de metil în alcool 70°, saturată la cald; *b)* soluție 5% acid oxalic. La 100 cc din sol. decantată de violet de metil se adaugă 5 cc din sol. acid oxalic. Timpul de colorare este de 1 — 3 minute. Se scurge colorantul şi se varsă pe lame, sau în godeu, pentru oxidare, o cantitate din sol. de iod iodurat (sol. sat. de iod în sol. 3% de iodură de potasiu). Timpul: câteva secunde.

5. *Diferențiere.* Secțiunile întinse pe lame sunt uscate cu hârtie de filtru şi diferențiate cu amestec, în părți egale, din ulei de anilină şi xilen. Durata diferențierii variază după intensitatea colorării.

6. Se spală de mai multe ori în xilen pur, pentru a scoate uleiul de anilină, care ar continua diferențierea. Montare în balsam de Canada.

Rezultate. Fibrele gliale se colorează în albastru-închis, ca şi nucleii. Meningele în albastru-violet. Restul țesutului nervos în galben. Țesutul conjunctiv rămâne necolorat. Colorația reuşeşte mai ales pe material uman.

Toate diferențierile cu ulei de anilină sunt dificile, deaceea şi rezultatele sunt inegale.

§ 1132. — **Metoda Benda** (1900) utilizează piese care au fost fixate în formol şi ținute 2 zile în mordantul Weigert. După o spălare de 24 de ore, piesele sunt cromizate 2 zile în sol. 0,5% acid cromic. Spălare timp de 1 zi. Includere la parafină. Secțiunile, lipite pe lame, sunt colorate după tehnica următoare: 1) mordansare în sol. alaun de fier 4%, timp de 24 de ore; 2) după o scurtă spălare în apă de robinet,

sunt trecute în colorantul preparat din sol. concentrată în alcool 70° de sulfalizarinat acid de sodiu. Din acesta se toarnă câteva picături în apă distilată. Timpul colorării este de 2 ore; 3) scufundare în apă distilată şi uscare rapidă cu hârtie de filtru; 4) colorare în sol. 0,1% albastru de toluidină, la cald până ies vapori, continuând acţiunea colorantului în soluţia răcită timp de 15 minute; sau se face colorarea la rece 24 de ore; 5) spălare în sol. 1% acid acetic; 6) uscare cu hârtie de filtru. Deshidratare prin cufundare în alcool absolut; 7) diferenţiere în creozot, sub control microscopic, timp de 10 minute; 8) uscare cu hârtie de filtru, clarificare în xilen, montare în balsam.

Rezultate. Pe lângă colorarea fibrelor gliale în albastru sunt colorate şi granulaţiile Nissl. Tot fondul este colorat în roşu brun.

§ 1133. — **Metoda Lhermitte** permite rezultate mai constante, pe piese normale sau patologice, evidenţiind celulele şi fibrilele nevroglice. 1) Se fixează piesele dela prosectură sau dela animale în sol. 10% formol, timp de 2—3 zile; 2) secţiuni, dela microtomul cu congelare, se trec în apă distilată şi apoi în *refixator I*: sol. saturată apoasă de sublimat coroziv, timp de 2 ore, urmată de trecerea în *refixator II:* sol. 1% acid cromic 35 cc, sol. 1% acid osmic 3 cc, sol. 2% acid acetic 7 cc, apă distilată 35 cc. In acest amestec secţiunile stau 2 zile; 3) *colorare.* Secţiunile sunt spălate în apă şi montate pe lame. Se face coloraţia în sol. 1% albastru Victoria (soluţia mai veche). Coloraţia la cald (56°), trecând lama sub flacără de alcool de 10—12 ori, lăsând să se răcească între trecerile prin flacăre; 4) *diferenţiere pe lamă,* fără spălare, cu soluţie iodo-iodurată (Lugol) 1:2:300 timp de 1 minut; 5) uscare cu hârtie de filtru. Deshidratare în alcool absolut; 6) diferenţiere (continuare) cu amestec ulei de anilină + xilen. Deshidratare—xilen; 7) montare în balsam de Canada.

Rezultate. Fibrele nevroglice sunt colorate în albastru-intens, nucleii în albastru. Se poate face o supracolorare cu eozină, eritrozină, roşu de Congo. Metoda se aplică pe piese din formol, este mai uşor de aplicat şi mai constantă.

§ 1134. — Rubaşchin (1904) a propus o coloraţie a nevrogliei cu violet de metil B, în soluţie saturată apoasă sau în soluţie alcoolică, amestecată cu apă anilinată (3:1). După coloraţie se face tratarea secţiunilor cu soluţie iodo-iodurată. In timpul deshidratării secţiunile sunt diferenţiate cu ulei cariophilorum sau cu ulei de anilină. Clarificare în xilen. Montare în balsam.

Rezultate. Fibrele gliale apar violete; citoplasma nevrogliei albastru-clar. Granulaţiile Nissl şi nucleii celulelor nervoase sunt colorate. Fibrele nervoase sunt necolorate. Metoda nu dă rezultate în substanţa cenuşie din creier şi cerebel.

§ 1135. — Gălăşescu (1908) dă o tehnică în care întrebuinţează violetul de metil 5 B, în soluţie saturată alcoolică, la cald. Fixează coloraţia prin sol. Gram şi diferenţiază cu ulei de anilină + xilen.

Rezultate. Coloraţia electivă pentru celulele nevroglice. Citoplasma apare în albastru-palid, nucleul închis, cu cromatina aparentă. Prelungirile celulare omogene, colorate în violet.

§ 1136. — Nevroglia protoplasmatică se colorează şi cu metoda Mallory (hematoxilină 1,75 g, sol. 10% acid fosfomolibdic 10 cc, fenol 5 g, apă distilată 200 cc), din care se face o diluţie slabă: 3 picături la 2 cc apă. Durata colorării este de 2—3 minute. Secţiuni la ghiaţă, din piese fixate în mordant Weigert.

Rezultate. Nevroglia protoplasmatică se colorează în albastru-violet; celulele ameboidale în violet-roşu.

§ 1137. — **Metoda Holzer pentru gliofibrile** (după Roschin 1951): 1) fixare în formol; 2) secţiuni la ghiaţă; 3) se trec secţiunile timp de 30—90 de secunde în sol. 0,5% acid fosfomolibdic 1 parte, alcool absolut (sau 96°) 2 părţi; 4) secţiunile, trecute pe lame, sunt deshidratate prin apăsare cu o hârtie de filtru care a fost îmbibată în alcool 1 parte, cloroform 4 părţi. Secţiunile trebue să adere de lamă; 5) fără a se usca, secţiunile se colorează în soluţia de cristal violet 0,5 g, alcool absolut 2 cc, cloroform 8 cc; 6) se toarnă deasupra lamei, înclinată, dintr'o sol. de bromură de potasiu 10%, până ce secţiunea rămâne colorată uniform în violet-negru; 7) se şterge lama cu hârtie de filtru înmuiată în ulei de anilină 4 cc, cloroform 6 cc, sol. acid clorhidric 1% 1 picătură; 8) se diferenţiază în acest lichid până la culoarea violet-deschis; 9) trecere în xilen. Montare în balsam de Canada.

§ 1138. — **Metoda Snesarev pentru nevroglie** (după Roschin): 1) fixare formol; 2) spălare în apă. Secţiuni la ghiaţă, cât mai subţiri; 3) trecerea secţiunilor timp de 30 de secunde în sol. 1% acid fosfomolibdic 10 cc, apă distilată 10 cc. Se lucrează cu baghete de sticlă. Dacă este nevoie se adaugă din sol. 1% carbonat de potasiu 5—10 picături sau sol. 1% acid acetic 5—10 picături. Dacă soluţia este opalescentă se încălzeşte şi se lasă 24 de ore la termostat; 4) se clăteşte repede cu apă distilată; 5) se disociază uşor secţiunea într'un cristalizor larg cu apă distilată şi apoi se trece pe o lamă unsă cu albumină — glicerină; 6) se scurge apa de pe lamă, se usucă cu hârtie de filtru, îndoită în patru, apoi muiată în alcool metilic şi cloroform (1:2 sau 1:3); se toarnă din această soluţie pe lamă pentru a complecta deshidratarea; 7) pe preparatul încă umed se toarnă din sol. May-Grünwald şi se ţine la cald cel mult 1 minut; 8) se adaugă 1—2 picături apă distilată şi se continuă colorarea; 9) se spală colorantul cu apă distilată şi se diferenţiază în acid acetic glacial 1 parte, apă distilată 2 părţi. Se diferenţiază până ce apare netă distincţia dintre substanţa cenuşie şi albă a centrilor nervoşi; 10) se spală cu apă şi se supracolorează cu eritrozină 1 g, apă distilată 150 cc, acid acetic glacial II—III picături; 11) se spală preparatul în apă distilată, timp de 3—5 minute; 12) se scurge apa. Se usucă cu hârtie de filtru; 13) se trece repede prin xilol, acetonă. Montare în balsam.

Rezultate. Gliofibrilele apar albastre; corpusculii lui Negri în albastru-închis; nucleolul celulelor nervoase în roz. Mielina se colorează în roşu, nucleii celulelor gliale apar roşii, axonii fibrelor mielinice în albastru marin. Metoda este mai puţin electivă decât a lui Holzer, are însă avantajul că pune în evidenţă multe elemente structurale. Prezintă un colorit viu cu contrast evident.

§ 1139. — **Metodele de impregnare folosite în studiul ţesutului glial.** Prin metodele de coloraţie nu s'a reuşit decât să se evidenţieze bogăţia de fibre nevroglice, mai ales din substanţa albă a centrilor nervoşi şi oarecare aspecte funcţionale ale celulelor, mai ales astrocitele. Nu s'au putut obţine date asupra întregului ţesut nevroglic, cu variaţia sa de elemente celulare în raport cu fiziologia multiplă, decât prin metoda impregnărilor. Prin metoda de impregnare Golgi s'au putut pune în evidenţă aspecte ale nevrogliei fibrilare şi protoplasmatice, însă cele mai multe date asupra ţesutului glial au fost obţinute prin impregnările de tip nou: metoda cu sublimat clorură de aur, a lui Cajal, metoda cu tanat de argint şi metoda cu carbonat de argint. Metodele de impregnare sunt, până la un punct, speciale pentru diferitele elemente din ţesutul glial: *a)* pentru astrocite — cu cele două aspecte: protoplasmatică şi fibroasă; *b)* pentru oligodendroglie; *c)* pentru microglie. Unele metode impregnează deseori, în acelaş timp, ultimele două varietăţi; deosebirile structurale ale elementelor sunt destul de evidente pentru a le putea deosebi.

Metodele de impregnare pentru macroglie

§ 1140. — *Astrocitele* — nevroglia protoplasmatică şi fibrilară, care fuseseră studiate şi cu metodele de coloraţie pe care le-am trecut în revistă — au fost restudiate graţie metodelor de impregnare, putându-se face apropierea dintre aspectele găsite în substanţa cenuşie şi cele găsite în substanţa albă a centrilor nervoşi. Picioruşele perivasculare ale celulei nevroglice din substanţa albă, în special, au putut fi studiate graţie acestor metode.

§ 1141. — **Metoda cu sublimat-clorură de aur.** Sunt necesare următoarele soluţii: *a)* soluţie formol — bromură de amoniu: formalin 14 cc, bromură de amoniu 2 g, apă distilată 86 cc; *b)* soluţie sublimat — clorură de aur: sublimat coroziv 0,50 g, sol. 1% clorură de aur 10 cc, apă distilată 50 cc. Se disolvă la cald sublimatul pulverizat în apă distilată şi apoi se adaugă clorura de aur. Se filtrează; *c)* baia fixatoare Cajal: tiosulfat de sodiu 5 g, apă distilată 70 cc, alcool 95° 30 cc, sol. concentrată de bisulfit de sodiu 5 cc.

Tehnica. 1) Fixarea. Fragmente de 5 mm, se recoltează cât mai curând după moarte şi se pun în soluţii fixatoare (*a*), la temperatura camerei timp de 4—25 de zile. Timpul este mai scurt pentru astrocitele

protoplasmatice. Fixare lungă pentru nevroglia fibroasă; 2) secţiuni la ghiaţă cu o grosime de 25 μ. Se trec secţiunile în apă distilată, cu câteva picături de formol; 3) spălarea rapidă în două vase cu apă distilată; 4) impregnare. Trecere în soluţia (*b*) proaspăt preparată, în cantitate suficientă. Intr'o formulă ulterioară, Cajal a redus cantitatea de sol. clorură de aur la 6 cc. Impregnarea se face la întuneric, facultativ, la 22°, timp de 4—6 ore. Când secţiunile au luat o culoare purpurie, se mişcă uşor vasul; 5) fixare. Se trec secţiunile în sol. (*c*) timp de 6—10 minute; 6) spălare în alcool 50°. Montare pe lamă; 7) deshidratare, uscare cu hârtie de filtru. Complectarea deshidratării cu alcool absolut; 8) clarificare cu ulei de origan şi xilen, sau fenol-creozot-xilen. Montare în balsam de Canada.

§ 1142. — *Rezultate şi discuţii asupra metodei.* Sublimatul face ca astrocitele să devină aurofile, clorura de aur singură dând o coloraţie difuză. Există o balansare între afinitatea pentru aur a corpului celular şi expansiuni; când acestea sunt mai colorate, celula este mai palidă. Primele ce se impregnează sunt astrocitele protoplasmatice din substanţa cenuşie, optimum obţinut fiind după 2—3 zile de fixare. Nevroglia fibrilară din substanţa albă se impregnează mai târziu. In fixările prelungite, nevroglia protoplasmatică se impregnează greu sau devine refractară, în timp ce nevroglia fibrilară este intens impregnată. In astrocitele din substanţa albă se pot distinge: corpul celular cu gliosomi, prelungirile, picioruşele perivasculare, uneori se pot urmări fibrele care traversează celulele. Astrocitele prezintă, uneori în timpul agoniei, dar totdeauna curând după moarte o fragmentare a expansiunilor (clasmatodendroză), deaceea recoltarea trebue făcută foarte curând după moarte. Din oligodendroglie şi microglie nu apar decât cel mult nucleii şi un halo perinuclear, astfel că metoda de impregnare este oarecum specifică astrocitelor. Formele embrionare nu se colorează decât în stadiul de astrocite, deaceea metoda serveşte ca un indicator de diferenţiere celulară din neoplasme. In glioame nu se colorează decât în stadiul astrocitar. Nicio celulă din meduloblastom nu este impregnată.

§ 1143. — O modificare a metodei Cajal, pentru piesele anatomo-patologice, fixate timp îndelungat în formol, este următoarea: 1) se fac secţiuni la ghiaţă cu o grosime de 15—30 μ; 2) spălare rapidă în apă distilată, schimbată de trei ori; 3) trecere în sol. 10% amoniac în apă, 24 de ore; 4) spălare rapidă în apă distilată schimbată de două ori; 5) trecere în sol. 10% acid bromhidric (pur, 41%) timp de 2—4 ore; 6) spălare rapidă în apă distilată cu câteva picături de apă amoniacală (2 vase); 7) trecerea în sol. sublimat clorură de aur (*b*) din metoda Cajal. Restul timpilor ca în metoda Ramon y Cajal, sublimat clorură de aur.

§ 1144. — **Metoda cu tanat de argint a lui Hortega** este o modificare a metodei primitive a lui Achucarro (1911), care a introdus utilizarea acidului tanic ca mordant. Are avantajul că pune în evidenţă unii com-

ponenți protoplasmatici. 1) Fixare în formol 10% timp de 10 zile; 2) secțiuni la ghiață, de 10—15 μ; 3) spălare în apă distilată; 4) mordansare în sol. 3% acid tanic, la 50°, timp de 5 minute; 5) spălare în apă distilată, cu IV picături amoniac; 6) impregnare în lichidul argento-amoniacal, Bielschowsky, clasic, diluat 1/10, cu apă distilată (sau se prepară în felul următor: din soluția NO_3Ag 10% se iau 30 cc, se adaugă 40 picături din sol. NaOH 40%. Precipitatul se spală de 10—12 ori cu apă distilată. Se adaugă 50 cc apă distilată și se disolvă precipitatul cu picături de amoniac. Nu se adaugă nicio picătură în plus de amoniac. Se complectează cu apă distilată până la 150 cc). Secțiunile se trec prin 3 băi, în lichidul impregnat. In ultima baie, secțiunile iau o culoare galbenă-închis; 7) spălare rapidă în 2 cristalizoare cu apă distilată; 8) reducere în formol neutru, 15%; 9) virare în clorură de aur 1/500, timp de 20 de minute; 10) fixare în tiosulfat de sodiu 10%; 11) deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Impregnarea dă detalii citologice mai multe în astrocite: granulații, gliosomi, fibre gliale.

Se pot pune în evidență și neurofibrilele, miofibrilele și uneori tecile de mielină.

§ 1145. — Metoda Del Rioy Hortega cu litiocarbonat de argint. In această metodă, fiecare din timpii principali se modifică în raport cu piesa cercetată. Impregnarea se desfășoară sub controlul microscopic. Este deci o metodă flexibilă, nu un instrument dur în mâna cercetătorului. 1) *Fixare.* Blocuri nu mai mari de 1 cm. *a)* dacă sunt piese proaspete: se fixează în amestecul formol 14 cc, bromură de amoniu 2 g, apă distilată 86 cc. Durata fixării: pentru astrocitele fibrilare 30 de zile, pentru astrocitele protoplasmatice 20—40 de zile. Fixarea la 38° scurtează timpul fixării la 14—21 de zile; *b)* dacă piesele au fost fixate înainte în formol, *secțiunile* la ghiață se *refixează* în următorul amestec: formol neutru 30 cc, bromură de amoniu 3 g, apă distilată 70 g la 38°, timp de 4 ore; 2) secționarea pieselor dela punctul (*a*), la congelare la o grosime de 15—25 μ. Secțiunile se trec în apă cu puțin amoniac pentru a-și recăpăta flexibilitatea; 3) spălare în apă distilată pentru deformolizare; 4) impregnare în soluție de litiocarbonat de argint.

Prepararea lichidului de impregnare. Se iau 5 cc din sol. 10% NO_3Ag, la care se adaugă 20 cc sol. saturată carbonat de litiu. Precipitatul format se disolvă cu picături de amoniac, lăsându-se câteva cristale nedisolvate (sau se spală precipitatul cu 50 cc apă distilată, se decantează și apoi se adaugă 15 cc apă distilată și se adaugă picăturile de amoniac). Se adaugă apoi apă până la 75 cc. Se filtrează. Soluția se păstrează în sticlă brună.

Operația impregnării. Se trec 6—10 secțiuni într'un cristalizor Pyrex care conține 10 cc lichid de impregnare. Se adaugă câteva picături de piridină, pentru a nu se produce spumă la suprafața lichidului,

se acoperă și se încălzește cu o lampă de alcool la 45—50°, mișcând ușor cristalizorul. Timpul este de 3—5 minute. Lichidul nu trebue să devină brun. Secțiunile iau o culoare chihlimbarie-închis. Se va monta câte o secțiune pe lamă și se va controla la microscop mersul impregnării. Dacă nu este suficientă, se va prelungi ședera în baia caldă de impregnant. Se pot adăuga 10—12 picături alcool 96° în baia de carbonat de argint, pentru a mări puterea de impregnare; 5) spălare în apă distilată, până ce secțiunile cad la fund; 6) reducere rapidă în formol 1%; 7) spălare prelungită; 8) virare în sol. de clorură de aur 1/500. Se poate încălzi până ce secțiunile iau o culoare purpurie; 9) fixare prin trecere directă în sol. tiosulfat de sodiu 5%; 10) spălare în apă distilată, timp de 30″; 11) deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Foarte favorabile pentru astrocite, care apar clare pe fondul necolorat; nucleii, granulațiile de pigment, fibrele apar evidente. Gliosomii nu se evidențiază bine. Este o metodă bună pentru piesele fixate demult în formol și pentru astrocitele patologice. Virarea în clorură de aur nu este obligatorie.

§ 1146. — Un alt procedeu pentru impregnarea astrocitelor este următorul: 1) întărirea blocurilor subțiri, din piese proaspete, în soluția formol — bromură de amoniu, la termostat 38°, timp de 1 zi; 2) secțiunile la ghiață de 15 μ, *se trec în formol 1% sau* : 1) se fixează, timp de 7 zile, în formol 10% întreg creierul dela animal (de preferat să se injecteze sol. fixatoare, imediat după moarte, prin carotida internă); 2) secțiunile la ghiață, se spală în apă distilată, cu I picătură amoniac pe cc, timp de 12 ore. Se spală repede și se trec în sol. 10% acid bromhidric la 38°, timp de 1 oră; 3) pentru ambele situații, se spală repede în apă distilată (schimbată de două ori); 4) se trec câte 4—6 secțiuni într'un cristalizor, la întuneric, în care se găsește următoarea soluție: sublimat 1 g, sol. 1% clorură aur 10 cc, apă distilată 50 cc (preparat după indicațiile dela § 1141). Când începe a apărea culoarea purpurie se începe controlul microscopic. Dacă astrocitele au apărut, se poate monta preparatul. Impregnarea se face la temperatura camerei. Căldura verii impiedică reușita; 5) spălare apă distilată; 6) fixare în tiosulfat de sodiu 3%; 7) spălare prelungită; 8) secțiunile sunt pescuite pe lame și se face deshidratarea, după uscarea cu hârtie de filtru, cu alcool 95°. Clarificare în lichid Hortega (creozot, fenol $\overline{aa}$ 10 cc, xilen 80 cc). După uscare, se montează în balsam.

Rezultate. Metoda este ușor de aplicat și întrunește toate modificările utile propuse în celelalte procedee. Se aplică pe piese proaspete și pe cele vechi deja fixate. Este scurtă ca durată. Dă rezultate constante. *Poate servi ca metodă de rutină pentru nevroglia protoplasmatică și fibrilară.*

Metode pentru oligodendroglie

Acest element celular se poate pune în evidență numai prin metoda impregnărilor.

§ 1147. — **Metoda Del Rio y Hortega** cu carbonat de argint: 1) *fixarea* pieselor în formol—bromură de amoniu (formula dată § 1145) timp de 48 de ore; 2) *bromurarea*. Se trec piesele în soluția fixatoare, încălzită la 45—50°, timp de 10 minute; 3) secțiuni la ghiață, de 15—20 μ; 4) spălare în apă distilată, în 2 vase, primul având 10 picături amoniac; 5) *impregnarea* cu soluția concentrată de carbonat de argint (Hortega).

Preparare: la 5 cc sol. 10% NO_3Ag se adaugă 20 cc din soluția de carbonat de sodiu pur 5%. Precipitatul se disolvă cu amoniac; se agită flaconul. Se adaugă apă distilată până la 45 cc. Se filtrează. Se păstrează timp îndelungat, în sticlă colorată. Impregnarea se face sub controlul microscopului. După 5 minute se scoate o secțiune și se cercetează; 6) spălare în apă distilată, mișcând cristalizorul, timp de 15 secunde; 7) *reducere* în sol. formol 1%. Aici nu se mișcă prea mult cristalizorul; 8) spălare în apă distilată; 9) *virare* în clorură de aur 1/500 până ce secțiunile iau o culoare cenușie; 10) fixare în sol. tiosulfat de sodiu 5%; 11) spălare în apă distilată; 12) deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Oligodendroglia se impregnează în mod electiv. Microglia apare deasemenea impregnată. Astrocitele se impregnează slab.

§ 1148. — O modificare recomandabilă utilizează o bromurare mai puternică a secțiunilor, o mordansare cu carbonat de sodiu, iar lichidul de impregnare este mai diluat, acționând mai lent. 1) Fixarea în formol timp de 1 săptămână și refixare în formol-bromură de amoniu, mai ales pentru piesele vechi; 2) secționare la microtomul cu congelare. Secțiunile de 20 μ grosime se primesc în apă distilată, cu formol 1%; 3) deformolizare în apă distilată cu 10—15 picături amoniac, timp de 12 ore; 4) bromurarea secțiunilor în amestecul de acid bromhidric 5 cc (din sol. 40%), apă distilată 95 cc, la termostat 38°, timp de 1 oră; 5) spălare în 3 vase cu apă distilată; 6) *mordansare*: în acest scop se trec secțiunile în sol. 5% carbonat de sodiu (chimic pur), timp de cel puțin 1 oră; 7) impregnare. Secțiunile pot fi sau nu spălate, sunt trecute în sol. carbonat de argint Hortega, soluție slabă. Soluția preparată ca la § 1147, însă se face diluția până la 75 cc. Durata este de 3—5 minute. Secțiunile se țin până iau o culoare cenușie-brună, sau se face control microscopic al mersului impregnării; 8) reducere în sol. 1% formol; se agită vasul; 9) spălare în apă distilată; 10) virare în clorură de aur 1/500. Secțiunile devin cenușii cu nuanță albăstruie; 11) spălare în apă distilată; 12) deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Impregnarea oligodendrogliei și microgliei este constantă. Diferențierea lor se face pe date morfologice. Se poate adapta ca o metodă de rutină, putându-se aplica și pe piese fixate mai demult în formol.

Metode pentru microglie

§ 1149. — In afară de metoda 1147, care pune în evidență odată cu oligodendroglia și microglia, există și metode oarecum speciale pentru microglie.

§ 1150. — **Metoda Hortega.** 1) Fixare. Piese mici de 3 mm, se fixează în formol—bromură de amoniu, după formula dată, la temperatura camerei, timp de 2—3 zile; 2) bromurarea se face ținând piesele în lichidul fixator la temperatura de 50°, timp de 10 minute; 3) secțiuni la ghiață, de 20—25 μ, care se primesc în apă distilată; 4) deformolizare în 3 vase cu apă distilată, unul având câteva picături de amoniac; 5) impregnare în soluția de carbonat de argint, preparată după indicațiile dela § 1147, făcându-se diluția prin adăugare de apă distilată până la 75 cc. Se trec câte 4—5 secțiuni în soluția argentică. Impregnarea se face sub controlul microscopului, începând dela prima jumătate de minut. Se trece secțiunea în reductor și se montează provizoriu pentru a fi examinată. Următoarele secțiuni se scot după 3/4—1—1½—2 minute de ședere în baia de carbonat de argint. Dacă impregnarea este prea slabă se poate încălzi soluția. Secțiunile iau o culoare de chihlimbar; 6) reducere în sol. 1% formol, timp de aproximativ 1 minut. Se face controlul microscopic. Secțiunile iau culoarea cenușie-deschis.

Odată stabilit timpul optim pentru impregnare și reducere, se poate lucra cu mai multe preparate. Controlul microscopic, pentru cercetarea rezultatului (celulele microgliale apar ca mici păianjeni negri), este absolut necesar pentru stabilirea duratei timpului de impregnare; 7) spălare apă distilată; 8) virare în clorură de aur 1/500, unde secțiunile devin cenușii. Culoarea slab purpurie arată o impregnare prea puternică, cuprinzând și alte elemente; 9) fixare în sol. 5% tiosulfat de sodiu, timp de 1 minut; 10) spălare în apă distilată. Supracolorare facultativă cu picrofuxină; 11) deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Microglia apare colorată în negru, în caz de supraimpregnare apare și nevroglia fibrilară. Dacă nu a reușit impregnarea, se poate relua metoda după trecerea secțiunilor în alcool absolut, 30 de minute. Metoda cere respectarea riguroasă a condițiilor unei bune impregnări.

§ 1151. — Hortega a modificat în 1927 metoda sa, pentru a se putea pune în evidență și celulele reticulo-endoteliale și macrofagele din țesuturi, în afară de microglie. In această modificare se pregătește impregnarea secțiunilor prin trecerea lor în amestec de piridină, amoniac și apă distilată, în părți egale, sau în sol. 5% sulfit de sodiu. Impregnarea se face trecând secțiunile prin 3 vase cu sol. carbonat argint, ținând 1/2 minute în primul și câte 1 minut în celelalte două. Ceilalți timpi sunt asemănători tehnicii precedente.

§ 1152. — **Modificarea Niculescu - Horneț.** Acești cercetători în neurohistologie au modificat compunerea lichidului de impregnare, care

este pe bază de sublimat—clorură de aur, iar secțiunile au suferit bromurarea în acid bromhidric. 1) Piese fixate de mult timp în formol 10% sau formol — bromură de amoniu; 2) secțiuni la ghiață de 20 μ grosime; 3) deformolizare în 100 cc apă distilată + 10 — 15 picături amoniac, timp de 12—24 de ore; 4) bromurare în acid bromhidric 5 cc, apă distilată 95 cc la 37° timp de 1 oră; 5) spălare în 3 vase cu apă distilată și în al patrulea în afară de apă distilată se adaugă și câteva picături de acid acetic; 6) impregnare la întuneric în sol. 1% clorură de aur 7 cc, sol. saturată de sublimat coroziv 25 cc, apă distilată q. s. p. 50 cc (se mai pot adăuga 15 picături acid acetic). Secțiunile iau o culoare roșie-purpurie. Timpul de impregnare este de 60 de minute la 37° sau 15 ore la temperatura laboratorului; 7) reducere în sol. 5% acid oxalic, până la culoarea purpuriu-închis, timp de câteva minute; 8) spălare; 9) fixare în sol. 5% tiosulfat de sodiu; 10) deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Nevroglia fibrilară și protoplasmatică se impregnează bine. Picioruşele perivasculare apar foarte evidente. Se produce o depunere fin granulară pe gliocite și prelungiri, vizibilă numai la măririle însemnate.

§ 1153. — Metoda Niculescu - Horneț cu argint amoniacal pentru impregnarea țesutului glial: 1) utilizează piese de sistem nervos fixate de mult timp în formol 10 — 15% (material vechi, de prosectură); 2) secțiuni la ghiață, de 15—20 μ; 3) deformolizarea secțiunilor se face în apă cu amoniac (apă distilată 100 cc, amoniac 15—20 de picături), timp de 24 de ore; 4) trecerea secțiunilor în sol. 5% acid bromhidric (48,5°) la 37° timp de 1 oră; 5) spălare în mai multe vase cu apă distilată; 6) impregnare în sol. argint amoniacal Bielschowsky 10 cc, apă distilată 40 cc. Se face la cald, la flacăra mică a unui bec de gaz, timp de aproximativ 15—30 de minute. Secțiunile trebue să capete culoarea galbenă-brună (tabac). Se lasă să se răcească; 7) spălare rapidă în apă distilată; 8) reducere în sol. 5% formol; 9) spălare apă distilată; 10) virare, în sol. 1/500 clorură de aur, timp de 10—20 de minute; 11) spălare rapidă și fixare în tiosulfat de sodiu 5%; 12) spălare prelungită, deshidratare, clarif care, xilen-fenolat. Montare în balsam.

Rezultate. Nevroglia clasică este impregnată constant și frumos. Microglia deasemenea este vizibilă. Țesutul conjunctiv fibrilar perivascular deasemenea se pune în evidență. Metoda este recomandabilă mai ales pentru studiul tumorilor.

TEHNICI PENTRU SISTEMUL NERVOS PERIFERIC ȘI TERMINAȚII NERVOASE

§ 1154. — Multe din tehnicile pentru studiul sistemului nervos central pot fi adaptate și pentru cercetarea formațiunilor nervoase periferice (trunchiuri și plexuri, centri nervoși periferici). Vom avea și aici tehnici

pentru neurofibrile și tehnici pentru tecile de mielină. Însăși tehnica pentru oligodendroglie a fost adaptată și pentru studiul tecii lui Schwann, celulele acesteia fiind omologate cu nevroglia. Sunt însă și tehnici proprii pentru cercetarea sistemului nervos periferic, care vor fi expuse în cele ce urmează. Metoda coloraței vitale (deși are o aplicație mai redusă și pentru sistemul nervos central), va fi mai pe larg studiată aici, având o aplicare mai întinsă pentru studiul inervației țesuturilor și organelor, și în special pentru terminațiile nervoase.

§ 1155. — Recoltarea nervilor se va face cu multă grijă, fiind vorba de formațiuni care pot fi strivite printr'o manipulare neîndemânatică, sau să dea loc la alterări mecanice care să se confunde cu cele patologice. Trebue să se socotească fibrele cu mielină ca niște tubi sensibili la traumatisme, ca și cum ar fi de sticlă, teaca de mielină putând fi foarte ușor sfărâmată și transformată în pi ături. Pentru recoltarea nervilor vezi § 1062. Fixatorii utilizați sunt, în linii mari, aceiași ca și pentru sistemul nervos central (formol simplu sau bromurat, alcool, acid osmic și alte amestecuri fixatoare).

§ 1156. — Examenul proaspăt al unui nerv se face luând un fragment de nerv, de mărime mijlocie, tăiat cu grijă, cu o foarfecă foarte ascuțită și disociat pe lamă cu acele obișnuite de disociere. Se acoperă cu lamela și se examinează. Nu se adaugă niciun lichid (soluție clorurată izotonică sau apă distilată), deoarece se produc modificări structurale ale tecii de mielină. Se examinează la lumină nu prea mare, cu irisul aproape închis și condensatorul puțin coborît. Preparatul nu se păstrează.

§ 1157. — Pentru a vedea tecile de mielină se adaugă o picătură din sol. 1% acid osmic peste nervul disociat, sau pe cale de disociere, și se acoperă cu o lamelă, sau se pun fragmente de nerv, nespălate, într'o sticlă de ceasornic, în sol. 0,5—1% acid osmic, se acoperă și se lasă la întuneric o jumătate de oră. După aceasta se spală fragmentele în apă distilată și se face disocierea pe lamă, într'o picătură de glicerină. Preparatul acoperit cu lamelă și lipit cu îngrijire se păstrează mult timp. Prin această metodă didactică evidențiem bine tubii nervoși cu mielină, observăm strangulațiile Ranvier și incizurile Schmidt-Lantermann. Se remarcă deasemenea deosebirile de diametre dintre fibre și prezența unor fibre fără teacă de mielină.

§ 1158. — Pentru un preparat de durată se ia un nerv, cum ar fi sciaticul de broască, se întinde de-a-lungul unei atele de lemn (un băț de chibrit), legându-se cu ață la extremități și se pune astfel în soluția fixatoare de acid osmic, timp de 12 ore. Se spală apoi în apă distilată 15—20 de minute; se trece în alcool pentru deshidratare (30—60 de minute) și se clarifică în terpineol. Se trece pe lamă, unde se disociază și apoi se montează în balsam.

Rezultate. Fibrele nervoase se văd în tot lungul lor, unele complect izolate, altele încă asociate în mănunchiuri. Se văd strangulațiile nodale.

fuxină anilinată sau prin impregnări după metoda Cajal, cu nitrat de uran.

§ 1169. — Doinicov (1911) a dat o metodă de colorație compusă, care face posibilă evidențierea tuturor constituenților normali și patologici ai tecilor fibrelor nervoase: 1) fixare în următorul amestec: lichid Müller 90 cc, formol 10 cc. Fixarea durează 24 de ore; 2) supracromare în lichidul Müler, timp de 4—6 zile; 3) trecere în lichidul Marchi (sol. 1% acid osmic 1 parte, sol. Müller 2 părți). Acest timp este facultativ și durează 8—10 zile; 4) includere la celoidină, sau disociere pe lamă; 5) trecerea secțiunilor în sol. saturată apoasă de acid fosfomolibdenic timp de 1 oră; 6) spălare apă; 7) colorarea în lichidul Mann (sol. 1% eozină 35 cc, sol. 1% albastru de metilen 35 cc, apă distilată 100 cc) timp de 24 de ore; 8) spălare rapidă apă. Deshidratare — diferențiere în alcool 96° și alcool absolut; 9) diferențiere în alcool absolut cu câteva picături din sol. potasă caustică (secțiunile își schimbă culoarea din albastru în roșu); 10) spălare în alcool absolut. Trecere în alcool absolut cu acid acetic, până ce secțiunile redevin albastre; 11) spălare în alcool absolut; 12) xilen fenolat, xilen pur. Montare în ulei de parafină. Preparatele trebue lipite.

Rezultate. Tecile Schwann apar foarte colorate. Mielina în roșu-clar. Mielina degenerată în brun-negru. Țesutul conjunctiv albastru.

§ 1170. — Pentru țesutul conjunctiv din structura nervilor se pot întrebuința metodele policrome ca: van Gieson, Masson, etc., iar pentru țesutul conjunctiv mai fin, peritubular, impregnările argentice.

§ 1171. — Metode pentru neurofibrilele din nerv. Axonul este constituit dintr'un pachet de neurofibrile în axoplasmă. Este evidențiat și urmărit pe secțiuni din nervi, sau pe secțiuni din organe, prin metodele studiate la sistemul nervos central și mai ales prin impregnările argentice.

§ 1172. — Metoda Ranvier, pentru evidențierea crucilor latine. Acest detaliu structural se evidențiază prin impregnarea nervilor cu nitrat de argint și apoi disocierea lor. Se pun fragmente din nervul sciatic, dela broască, în sol. 1% nitrat de argint, lăsându-se 2—24 de ore, la început la întuneric, apoi la lumină solară, pentru a se face reducerea. Nervul va fi întins pe o atelă de lemn, pentru a nu se retracta tubii nervoși. După o scurtă spălare în apă distilată, se trece un fragment pe lamă într'o picătură de glicerină și se disociază cu 2 ace de sticlă. Se montează în glicerină și se lipește. Se poate trece fragmentul pe lamă în alcool, făcând disocierea și deshidratarea aici; după clarificare, se montează în balsam.

Rezultate. La nivelul întreruperilor tecii de mielită (strangulații) se observă dispozitivul în formă de cruce, rezultat din depunerea de argint redus pe traiectul longitudinal al axonului și pe formațiunile transversale dela nivelul strangulației. Când impregnarea este mai reușită apar

și striurile lui Frommann și delimitarea endoteliilor perinevrei. Prin aceeași metodă se poate evidenția și teaca lui Henle. Se poate face și o colorație de contrast, cu eozină slabă, picrofuxină sau roșu de Congo.

§ 1173. — Pentru structura neurofibrilară a nervilor din țesuturi și organe, precum și pentru cercetarea traiectelor și a raporturilor lor cu țesuturile învecinate, aplicăm metodele de impregnare metalică cu aur, argint, osmiu sau mercur, pe care le-am studiat pentru sistemul nervos central și pe care le vom revedea, cu modificările și adaptările necesare, la capitolul tehnicilor pentru terminațiile nervoase.

§ 1174. — Pentru cercetarea ganglionilor simpatici, ca și pentru studiul centrilor nervoși intramurali (din cordul de broască, din pereții vezicii urinare, bronhiilor, sau din tubul digestiv), vom aplica rând pe rând toate metodele de cercetare expuse pentru sistemul nervos central, adică metodele de histologie generală pentru topografie, metode citologice pentru studiul celulelor nervoase izolate sau adunate în microganglioni, metode mielinice pentru a cerceta componența fibrelor mielinice din nervii pre-și postganglionari și din plexurile interganglionare. Intre cercetările pentru structura celulară enumerăm cercetări pentru condriom, aparat reticular Golgi, granulații Nissl, rețeaua neurofibrilară. Metoda Nissl se recomandă în mod special; ea ne oferă date importante asupra răspândirii celulelor nervoase în țesutul sau organul respectiv, secțiunea putând fi ușor cercetată pe toată întinderea ei. Pentru structura neurofibrilară sunt de recomandat metoda Cajal pe bloc, metoda Boecke, metoda Bielschowsky. In aplicarea ultimei metode trebue făcută modificarea de a trece secțiunile după acțiunea complexului argento-amoniacal în soluții diluate de acid, pentru a defavoriza impregnarea colagenului.

IMPREGNĂRILE METALICE PENTRU SISTEMUL NERVOS PERIFERIC ȘI TERMINAȚII NERVOASE

§ 1175. — Impregnarea cu clorură de aur. Metoda a fost întrebuințată în primele timpuri ale neurohistologiei pentru punerea în evidență a terminațiilor nervoase în cornee, epiderm, mușchi striați, plexurile intestinale. Astăzi se întrebuințează mai puțin, fiind, aplicată pentru fragmente ce vor fi apoi disociate. Uneori se poate aplica și pe secțiuni groase. Este de recomandat pentru vederea generală a distribuției plăcilor motorii în mușchii striați. Materialul de cercetat trebue să fie proaspăt și de preferat dela animale tinere. Pentru mușchi se recomandă: limba, mușchii ochiului sau intercostali, diafragmul. Manipularea pieselor se va face după toate regulile recomandate pentru impregnări, pentru a nu se produce precipitarea clorurii de aur (vase bine curățate și degresate, ace de sticlă, pense parafinate). Disocierea se face cu ochiul liber sau sub lupă. Fixarea care servește și de mordansare

se face într'un acid organic: acid citric din zeamă de lămâie sau acid formic. Impregnarea se face pe bloc. Reducerea se face prin acid formic. Montarea în glicerină.

§ 1176. — Metoda cu zeamă de lămâie, după Roschin: 1) fixare de fragmente mici, 3—5 mm, proaspete, ce se ţin în zeamă de lămâie proaspătă, filtrată prin flanelă. Se ţin piesele până devin transparente. Timpul aproximativ este de 10—15 minute; 2) fără spălare, sau cu spălare rapidă în apă distilată, piesele sunt trecute în sol. 1% cloruiă de aur la întuneric, timp de 10—60 de minute. Piesele trebue să capete o culoare violetă; 3) după spălare rapidă în apă distilată sau fără spălare se trec fragmentele în sol. 33% acid formic, timp de 12—24 de ore şi la întuneric. Dacă impregnarea s'a realizat, muşchiul capătă o culoare violetă, iar nervii sunt violeţi-negri; 4) spălare în apă distilată şi disociere cu pensa, foarfeca şi acele de disociat; 5) montare în glicerină. Lipire (se poate face şi deshidratare prin alcool şi montare în balsam).

§ 1177. — Tehnica cu acid formic: 1) se fixează fragmentele în sol. 25% acid formic, timp de 10—15 minute (piesele trebue să fie complect acoperite de soluţie. Se agită cristalizorul de câteva ori); 2) se usucă piesele pe un tifon, îndoit în multe foi, şi se trec în sol. 1% clorură de aur, timp de 20 de minute. Cristalizor colorat, se agită cristalizorul de câteva ori; 3) se usucă piesele pe un tifon şi se trec în sol. 25% acid formic, timp de 24 de ore la întuneric; 4) se usucă piesele pe tifon şi se trec în glicerină, în care se face disocierea; 5) montare în glicerină. Lipire atentă.

Rezultate. Trunchiurile nervoase şi terminaţiile nervoase în muşchii striaţi sunt foarte demonstrative. Structura fibrei musculare foarte frumoasă. Plăcile motorii foarte bine evidenţiate. Bună evidenţiere pentru terminaţiile nervoase din cornee.

§ 1178. — Impregnările argentice. Pentru studiul sistemului nervos periferic şi al terminaţiilor nervoase se întrebuinţează foarte mult metodele de impregnare argentică, metode care nu sunt decât adaptări ale tehnicilor studiate la capitolul sistemului nervos central, acomodate împrejurărilor deosebite de a avea alături de ţesutul nervos şi alte ţesuturi. In special prezenţa ţesutului conjunctiv, prin fibrele sale de reticulină şi cele elastice, aduce dificultăţi mari în aplicarea tehnicilor şi citirea preparatelor.

După natura organului de cercetat sau în funcţie de împrejurări neaşteptate, trebue să aplicăm metodele de impregnare fie pe piese întregi, impregnarea pe bloc, fie că facem impregnările pe secţiuni. Unele piese pot fi secţionate la ghiaţă, altele trebue să fie mai întâi incluse în celoidină sau parafină. De aici nevoia de a cunoaşte o serie mare de metode de impregnare, fiecare cu aplicarea sa: pe bloc, pe secţiuni dela microtomul cu congelare, sau pe secţiuni din piesa inclusă în celoidină sau parafină. In fiecare situaţie avem de urmat altă variantă. Includerea la parafină este necesară urmăririi terminaţiilor nervoase

fine, făcând secţiuni până la 3 μ. Această includere ne permite o seriere a [illegible] deaceea este cea mai utilizată. Includerea în celoidină îşi găseşte [illegible] planuri ce se pot disloca.

§ 1179. — Impregnări pe bloc. Metoda Cajal clasică, pentru sistemul nervos central, am văzut că a suferit o serie de modificări după scopul urmărit. Pentru cercetarea terminaţiilor nervoase este necesară o pregătire a fibrelor pentru impregnare, utilizând somnifere, cum ar fi cloralhidratul; deasemenea utilizăm disolvanţii lipoizilor din ţesuturi, care se opun impregnărilor. 1) Fixarea se face timp de 1—3 zile, în felul următor: *a)* o prefixare în cloralhidrat 2,50 g, alcool absolut 25 g, apă distilată 25 cc (se disolvă cloralhidratul în alcool absolut şi apoi se adaugă apă distilată). Organele cavitare se umplu cu lichidul prefixator, timp de 24 de ore, apoi se schimbă lichidul şi se micşorează fragmentele); *b)* după spălare rapidă în apă distilată se face fixarea în alcool amoniacal, timp de 24 de ore (alcool etilic 96°, cu V—VI picături amoniac la 100 cc); 2) impregnarea se face în termostat la 37°, în sol. 1% nitrat de argint, timp de 7—10 zile. Piesele au fost spălate în prealabil rapid cu apă distilată. Cristalizorul trebue să fie colorat; 3) reducere: spălare rapidă cu apă distilată şi trecere în pirogalol 1 g, formol 10 cc, apă distilată 90 cc. Reducerea se face la întuneric, timp de 24 de ore; 4) spălare în apă timp de 20 de minute (poate fi şi apă de robinet); 5) includere în celoidină sau parafină; 6) secţionare. Se fac şi secţiuni groase de 15—30 μ, pentru a putea urmări mersul fascicolelor nervoase, şi secţiuni fine, de 3—5 μ, pentru detalii structurale la nivelul terminaţiilor; 7) virare în sol. 1% clorură de aur 5 picături, apă distilată 20 cc. Virarea durează: 5—6 minute (timp facultativ, unele secţiuni putând fi montate direct în balsam după deparafinare); 8) fixarea clorurii de aur în sol. 5% tiosulfat de sodiu, timp de 10 — 15 minute; 9) spălare îndelungată în apă de robinet, timp de 1—3 ore; 10) deshidratare, clarificare, montare în balsam.

Rezultate. Fibrele nervoase din ţesut sunt colorate în galben-închis-brun, pe fondul galben-deschis, în preparatele neaurite. După aurire, fibrele au o nuanţă brună-neagră, pe fondul cenuşiu. Structura neurofibrilară se poate urmări până în terminaţiile nervoase.

Celulele nervoase deasemenea sunt puse în evidenţă.

§ 1180. — O modificare a metodei Cajal, pe bloc, de durată mai scurtă, care poate fi aplicată pentru terminaţiile nervoase în organele bogate în conjunctiv este următoarea: 1) fixare timp de 2 zile în alcool absolut 100 cc, amoniac 1 cc; 2) spălare în apă distilată $^1/_2$ —3 minute; 3) trecere în piridină, timp de 24 de ore; 4) spălare în apă distilată, des schimbată, timp de 24 de ore; 5) impregnare în sol. 2% nitrat de argint, timp de 3 zile la 37° şi întuneric; 6) clătire cu apă distilată; 7) reducere timp de 1—2 zile în pirogalol 4 g, formol 5 cc, apă distilată 100 cc; 8) spălare deshidratare, includere parafină; 9) aurire pe secţiuni, ca

în metoda Cajal; 10) ceilalți timpi sunt aceiași ca și în tehnica precedentă.

§ 1181. — **Metoda Deinec** (tehnica Roschin, 1951). 1) Fixare de fragmente mici timp de 20—90 de minute în amestecul alcool 90—100°. 30 cc, sol. 20% formol neutru 30 cc, sol. saturată acid arsenios 30 cc; 2) uscarea fragmentelor cu hârtie de filtru; 3) impregnare în sol. 2% nitrat de argint, în vas colorat, la temperatura camerei, timp de 8 zile; 4) spălare în apă distilată, rapidă (1—3 minute); 5) reducere timp de 24 de ore în hidrochinonă 2 g, sulfit de sodiu (Na_2SO_3) 0,50 g, formol neutru 5 cc, apă distilată 95 cc; 6) spălare în apă distilată, rapidă (1—3 minute); 7) deshidratare și includere rapidă în celoidină; 8) secțiunile se pot auri (neobligatoriu) în: *a)* rodanat de amoniu 1,5 g, tiosulfat de sodiu 1,5 g, apă distilată 50 cc, la care se adaugă 1 cc sol. 1% clorură de aur la fiecare 10 cc amestec (*a*). Se țin secțiunile până la înnegrire, obișnuit 3—10 minute; 9) spălare în apă de robinet 2 ore, apoi apă distilată 15 minute; 10) pentru diferențiere, dacă secțiunile sunt prea negre, le trecem în apă distilată 50 cc, acid sulfuric I picătură, hipermanganat de potasiu 2—3 cristale mici; 11) apă distilată 10—15 minute; deshidratare, clarificare, montare. Nucleii se pot colora, neobligatoriu, cu carmin.

§ 1182. — De Castro întrebuințează pentru terminațiile nervoase următoarea impregnare pe bloc, care derivă din metoda Cajal: 1) fixarea în amestecul: hidrat de cloral 2—4 g, apă distilată 50 cc, alcool 95° 50 cc, sol. 40% acid azotic 1—2 cc, timpul de fixare este 24 de ore (hidratul de cloral se poate înlocui cu etiluretan. Adausul de acid azotic poate lipsi pentru ganglioni sau cortex cerebral, iar pentru terminații nervoase în piele, glande, artere sau mușchi, nu trebue să depășească 1%); 2) spălare în apă curgătoare, timp de 6—12 ore; se reduce la o o oră dacă fixatorul nu a avut acid azotic; 3) trecerea blocurilor în alcool amoniacal, timp de 8—12 ore, II—III picături amoniac la 100 cc alcool 95°. Dacă fixatorul nu are acid azotic, se adaugă numai I picătură de amoniac; 4) spălare rapidă în apă distilată, pentru a scoate alcoolul; 5) trecere în sol. 1,5% NO_3Ag, timp de 5—7 zile, la 37°; 6) spălare în apă distilată și reducere în pirogalol 1 g, formol 5—10 cc, apă 70—100 cc. Reducerea durează 24—48 ore. (Hidrochinona, care servește uneori de înlocuitor al pirogalolului nu este recomandabilă); 7) deshidratare, includere la parafină. Secțiuni de 12—15 μ; 8) virare în clorură de aur 1/500 (facultativă). Supracolorare cu hematoxilină, carmin sau colorant bazic de anilină.

Rezultate. Metoda este mai elastică în modalitățile ei și poate fi aplicată pentru cercetarea terminațiilor nervoase în diferite organe.

§ 1183. — **Metoda Bielschowsky,** pe bloc. 1) Fixare în sol. 15—20% formol, timp de 8—10 zile; 2) spălare în apă de 3—4 ori; 3) trecerea pieselor în piridină pură, timp de 2—3 zile; 4) spălare în apă curgătoare 24 de ore; apoi apă distilată, schimbată des, timp de 24 de ore;

5) impregnare în sol. 2,5—3% nitrat de argint, la întuneric timp de 4—5 zile; 6) spălare rapidă în apă; 7) impregnare în sol. Bielschowsky (preparat după indicațiile § 1108), timp de 4—5 ore. (Se pornește dela sol. 10% NO_3Ag, se adaugă III picături soluție hidrat de sodiu la 4 cc sol. argintică. După solvare prin amoniac se diluează cu apă distilată până la 20 cc); 8) spălare rapidă, apoi se reduce cu formol 20%, timp de 12—24 de ore; 9) includere la parafină; 10) secțiunile sunt virate în sol. 1/500 clorură de aur, timp de 5—10 minute, după care devin cenușii; 11) spălare în apă distilată, 2 minute; 12) fixare tiosulfat de sodiu, 5—20%, timp de 10—15 minute; 13) spălare în apă distilată, 30 de minute; 14) deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Fibrele nervoase apar colorate în negru pe fondul cenușiu al preparatului. Impregnarea nu este egală în toată grosimea preparatului, ea fiind prea brutală la suprafață. Uneori elementele colagenului se impregnează și ele.

§ 1184. — **Metoda Boeke** pentru impregnare pe bloc. 1) Fixare. Piese proaspete, de mărimi care să nu depășească 2—3 cm pe latură și 4—5 milimetri în grosime, sunt fixate în amestecul: formol 10 cc, alcool 60° 90 cc. Se schimbă fixatorul de câteva ori, timp de 3—10 zile; 2) se scoate alcool prin trecere în sol. 10% formol, până ce piesele cad la fund; 3) impregnare în sol. 2% nitrat de argint, timp de 3—5 zile și la întuneric; 4) supraimpregnare, după spălare rapidă în apă în sol. argint amoniacal, preparat ca în metoda Bielschowsky (§ 1095), timp de 1—2 ore la întuneric; 5) reducere după spălare rapidă în sol. 20% formol, timp de 12 ore; 6) includere în parafină cât mai repede; 7) secțiunile groase de 5—25 μ, sunt montate direct, sau după aurire, după metoda obișnuită (§ 1172). Spălare îndelungată în apă. Montare în balsam de Canada.

Rezultate. Fibrele nervoase apar impregnate în negru, uneori putându-se urmări detalii fine. In organele bogate în țesut conjunctiv, fibrele nervoase sunt mascate deseori de impregnare, în cenușiul-brun al fibrelor conjunctive.

§ 1185. — O metodă apropiată de metoda Bielschowsky, care evită în bună parte impregnarea conjunctivului, utilizată și de cercetătorii sovietici în studiile lor asupra inervației organelor este următoarea: 1) fixare în formol acid sau neutru, în soluție foarte concentrată: sol. 50% formol, timp de 5 zile; 2) spălarea fragmentelor cu îngrijire în apă distilată, schimbată des, până la îndepărtarea oricărei urme de formol (se va cerceta dacă lichidul de spălare precipită sol. argento-amoniacală). O spălare prelungită este vătămătoare, ca și una insuficientă; 3) impregnare în sol. 3% nitrat de argint, timp de 6 zile la temperatura camerei; 4) spălare în apă distilată, schimbată des, timp de 1 oră; 5) trecerea fragmentelor în sol. argento-amoniacală, la un volum de 8—9 ori cât al piesei, timp de 20 de ore. (Se pornește dela sol. 10% NO_3Ag, din care se iau 10 cc, se adaugă 20 picături sol. 25% NaOH.

Se diluează cu 200 cc apă distilată. Se disolvă precipitatul cu amoniac. Cantitățile mari de hidroxid de sodiu ajută pătrunderea soluției și restrâng solubilitatea impregnării în xilen); 6) trece în apă distilată 100 cc, sol. 1% acid acetic 10 picături, timp de o oră; 7) spălare în apă distilată, timp de 1 oră. (Pentru a împiedica impregnarea colagenului, la nevoie se poate crește acidificarea soluției până la 50 de picături, și spălarea până la 18 ore); 8) reducere în sol. 50% formol neutru. Soluția va fi în făcută cu apă de robinet. Timpul de reducere este 1—4 zile (în medie). Durata reducerii este în raport cu permeabilitatea țesuturilor. Soluția va fi cantitate mare, 100 cc pentru fiecare bloc și se va schimba zilnic; 9) spălare, deshidratare, includere în parafină; 10) aurire pe secțiuni (§ 1182). Spălarea este prelungită, dela câteva ore la 7—10 zile.

Rezultate satisfăcătoare, dar necesită un timp lung pentru desfășurarea metodei.

Impregnarea argentică pe secțiuni la congelare

§ 1186. — Secțiunile pot proveni din piese care nu au fost incluse și sunt secționate direct la microtomul cu congelare. In alte cazuri structura pieselor a impus o includere în celoidină sau parafină. Impregnarea argentică este deosebită, în desfășurarea ei, după cum ne aflăm într'o situație sau alta. Mai toate tehnicile întrebuințate pentru impregnarea pe secțiuni nu sunt decât modificări ale metodei Bielschowsky, care dă rezultate atât de remarcabile pe secțiunile din sistemul nervos central, dar care, aplicată așa cum a fost recomandată la început, pentru terminațiile nervoase nu este selectivă, din cauza bogăției de țesut conjunctiv. Deaceea au fost propuse o serie de modificări, din care au ieșit metodele ce vom expune.

§ 1187. — Metoda Bielschowsky - Gros - Schultze (1918) pe secțiuni la congelare reprezintă metoda cea mai utilizată astăzi. Se deosebește de metoda Bielschowsky originală prin concentrația mai mare a soluției argentice, prin felul de preparare a complexului argento-amonical și mai ales prin faptul că se lucrează sub controlul microscopului. 1). Fixarea pieselor în sol. 10% formol. Timpul de fixare este variabil după mărimea pieselor 2) secționare la microtom cu congelare; 3) spălare în apă distilată; 4) trecerea secțiunilor în sol. 20% nitrat de argint, timp de cel puțin 1 oră la întuneric; 5) secțiunile se trec apoi în sol. 20% formol. Soluția va fi făcută cu apă de robinet. Se schimbă de 3—4 ori. Se țin în această soluție până nu mai ies vapori albi, timp de aproximativ 10 minute; 6) trecerea secțiunilor în sol. argento-amonicală (argint activat), timp de aproximativ 30—60 de secunde. Pregătirea soluției: la 5—10 cc din sol. 20% NO_3Ag se adaugă amoniac picătură cu picătură, până la disolvarea precipitatului brun ce se formează la început.

In plus se adaugă câte o picătură de amoniac [illegible]
Se trec în această soluție secțiunile, una câte una. Se cercetează la microscop, cu obiectivul mic, mersul impregnării. Dacă conjunctivul apare impregnat se mai adaugă amoniac în soluție (3 picături la 2 cc amestec, până ce fibrele nervoase apar negre pe fondul clar); 7) se trec apoi secțiunile în apă distilată 8 cc, amoniac 2 cc, timp de 1 minut; 8) se trec în apă distilată, acidulată cu câteva picături acid acetic, 1/2 — 1 minut; 9) aurire în sol. 1% clorură de aur III — V picături, apă distilată 10 cc, timp de 1 oră; 10) fixare în sol. 5% tiosulfat de sodiu, timp de 1/2—1 minut; 11) spălare în apă distilată; 12) deshidratare, clarificare în xilen. Montare în balsam. Se poate intercala după punctul (6) o trecere în soluție slabă de formol (I—III picături din sol. 10% în 10 cc apă distilată). Dacă impregnarea nu este suficientă, se poate trece din nou în soluția argento-amonicală.

Rezultate. Fibrele și terminațiile nervoase apar în negru, cu structura neurofibrilară, pe fond clar, decolorat.

§ 1188. — Metoda Lavrentiev, pentru evidențierea celulelor și fibrelor nervoase, precum și a terminațiilor nervoase în organe, pe secțiuni la ghiață, constitue un progres mare în tehnică, atât în ceeace privește fixarea pieselor, cât și urmărirea procesului de impregnare. 1) Fixare în amestecul «Afa»: alcool 96°, formol neutru sol. saturată, acid arsenios în părți egale, timp de 1 oră. (Formolul este neutralizat prin carbonat de magneziu, 20 g la 100 cc. Acidul arsenios se disolvă la 37°, în timp de 2—3 zile); 2) fără spălare, fragmentele se trec pentru refixare în sol. 20% formol neutru, timp de 2 zile, până la câteva luni. Durata refixării este în funcție de experiența cercetătorului. Pentru nervii senzitivi ai inimii, vezicii urinare 2—4 zile. Pentru mușchii netezi 10—20 de zile. O fixare prea lungă este dăunătoare impregnării; 3) spălare rapidă cu apă distilată; 4) secțiuni la congelare de 20—100 μ; 5) spălarea secțiunilor în apa în care s'au spălat fragmentele (nr. 3), apă care mai are deci urme de formol, favorabile impregnării; 6) trecerea secțiunilor în sol. 20% nitrat de argint, la 37° sau la temperatura laboratorului, timp de 1—30 de minute. Timpul se stabilește după organul în lucru, prin experiență; 7) trecere în sol. 20% formol, apoi în apă de fântână, pusă în 4—5 cristalizoare. Apariția de norișori albi este în raport cu bogăția de săruri din apă. Dacă este săracă se adaugă un mic cristal de NaCl la un litru apă; 8) se trece secțiunea în sol. argint amonical tip Bielschowsky (soluția argento - amonicală se prepară pornind dela sol. 20% NO_3Ag în care se adaugă picături din sol. 25% amoniac. Soluția se prepară într'o sticlă de ceasornic care poate fi pusă pe platina microscopului, în scopul de a urmări cu un obiectiv slab mersul impregnării. Se adaugă amoniac până ce se disolvă primul precipitat, fără a se adăuga în exces, se oprește la opalescența lichidului). Cu cât secțiunile au stat mai mult în sol. nitrat de argint, cu atât se adaugă mai mult amoniac. Dacă la examenul microscopic apar în negru nucleii

altor țesuturi și nervii nu sunt negri, se mai adaugă picături din soluția de amoniac; 9) dacă impregnarea pare reușită, secțiunea se trece, timp de 10—15 minute, în sol. 25% amoniac 1 parte, apă distilată 2 părți; 10) secțiunile se trec în apă distilată schimbată des, timp de câteva ore; 11) aurire în sol. 1/500 clorură de aur, până ce secțiunile iau o nuanță cenușie-violetă; 12) fixare în sol. 5% tiosulfat de sodiu; 13) spălare în apă distilată, 1—2 ore; 14) supracoloare (facultativă) cu hematoxilină-eozină, amestec Mallory, tricrom, van Gieson, Congorot; 15) deshidratare, clarificare, montare în balsam sau montare în gelatină, pentru a nu se zbârci elementele.

Rezultate. Foarte bune, fiecare timp fiind adaptabil piesei de cercetat.

§ 1189. — **Metoda Schultze** (1918) este o impregnare argentică pe secțiuni care au suferit acțiunea soluției de hidrat de sodiu. Reducerea în soluția de hidrochinonă - formol se face sub controlul microscopului, modificându-se după necesitate concentrarea lichidului reductor. 1) Fixare în sol. 10% formol, timp de 48 de ore; 2) secțiunile dela microtom cu ghiață se trec din apă distilată în soluție hidrat de sosdiu, timp de 24 de ore. Prepararea soluției: din sol. 4% NaOH se iau 10 părți, apă distilată 50 părți; 3) spălare în apă distilată 1—2 ore (schimbată de 4—6 ori); 4) impregnare în sol 10% nitrat de argint, timp de 24 de ore; 5) reducere în soluție formol — hidrochinonă. Soluția-mamă: hidrochinonă 2,50 g, apă distilată 100 cc, se adaugă formol 5 cc.

Se controlează sub microscop mersul reducerii, deosebindu-se fibrele negre nervoase de cele brune-cenușii ale țesutului conjunctiv. Se oprește reducerea când se observă fibrele fine nervoase. O ședere prelungită în reductor aduce o înnegrire a preparatului în totalitatea sa. O ședere prea scurtă nu pune în evidență țesutul nervos; 6) spălare prelungită în apă distilată; 7) deshidratare. Clarificare în xilen fenolat. Montare în balsam.

Rezultate. Experiența proprie are mare valoare în manipularea acestei metode, care a fost întrebuințată mult în cercetările asupra sistemului nervos vegetativ. Structura nervoasă neurofibrilară este bine pusă în evidență și terminațiile nervoase ușor de urmărit.

§ 1190. — **Metoda Troițchi** (1950) pentru piese incluse în celoidină: 1) fixare în formol; 2) includere în celoidină. Secțiuni de 10—12μ; 3) spălare prelungită în apă distilată; 4) impregnare în sol. 2—3% nitrat de argint, timp de 1—2 zile; 5) secțiunile sunt slab colorate în galben și se spală rapid în apă distilată, timp de 1—2 secunde; 6) trecere în sol. argint amoniacal. Poate fi: *a)* soluție diluată, timp de 15—20 de minute sau *b)* soluție concentrată, timp de 30—60 de secunde. (Soluția diluată: se iau 4 cc din sol. 10% NO_3 Ag, se adaugă amoniac cu picătura; până la dispariția precipitatului apărut la început. Se adaogă 3—5 picături de amoniac la soluția clară. Soluția de impregnat se prepară din această soluție-mamă: 1 picătură la 1 cc apă distilată. Soluția

concentrată: în soluția obținută după disolvarea precipitatului prin picături de amoniac, ca în alternativa de mai us, se adaugă apă distilată până la volumul de 12—16 cc. Aceasta ete soluția de impregnat); 7) secțiunile se trec repede în apă distilată 2-3"); 8) reducere în sol. formol 20—30%. Secțiunile iau o culoare brună-roșcată. In soluțiile mai slabe de formol, sunt cenușii. Timpul este de 5—10 minute; 9) aurire și fixare, facultativă; 10) spălare, deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate. Cercetătorul sovietic indică rezultatele bune de impregnare pe piese din sistemul nervos periferic și central.

Impregnări argentice pe secțiuni la parafină

§ 1191. — Impregnarea în bloc are dezavantajul de a compromite întreaga piesă în caz de nereușită a tehnicii, lucru posibil datorită variației de densitate a țesuturilor și deci în funcție de puterea de pătrundere a reactivilor. S'a căutat a se găsi mijlocul să se facă impregnare pe secțiuni de piese incluse în parafină și prin aceasta să se facă posibilă cercetarea pe secțiuni seriate și destul de subțiri.

§ 1192. — **Metoda Landau** (1940) este o adaptare a metodei Bielschowsky - Gros pe secțiuni la parafină. Soluții necesare: *a)* sol. 20% nitrat de argint; *b)* soluție de argint amoniacal (pornind dela sol. 20% nitrat de argint și utilizând numai amoniacul); *c)* sol. 10% formol neutru; *d)* sol. 1% clorură de aur; *e)* sol. 5% tiosulfat de sodiu; *f)* sol. 15% iodură de potasiu, sau 0,5% fericianură de potasiu.

Tehnica. 1) Secțiuni de 5—7 μ, lipite pe lame cu soluție apoasă foarte slabă de gelatină, la 35°; 2) lamele se deparafinează și se trec în sol, 10% formol la întuneric, timp de 12—24 de ore; 3) spălare în apă distilată; 4) trecere în soluția *(a)*, la întuneric și la 37°, timp de 1—2 ore; 5) spălare în apă distilată; 6) impregnare în sol. *(b)*, timp de 5 minute; 7) spălare rapidă în apă; 8) reducere în sol. 1% formol, timp de câteva minute. Operația se face sub controlul microscopului. Dacă impregnarea nu este suficientă, se trec secțiunile din nou în sol. de argint amoniacal și apoi se repetă reducerea. Se poate face această operație de câteva ori. Prin aceasta, impregnarea este mai plastică; 9) spălare în apă distilată, care oprește reducerea; 10) virare în clorură de aur și fixare în tiosulfat de sodiu, ca în metoda Bielschowsky-Gros; 11) diferențierea în sol. *(f)* dacă secțiunile sunt prea impregnate. Operația se face sub controlul microscopului; 12) deshidratare, clarificare, montare în balsam, sau fără deshidratare montare în lichidul Apathy modificat după cum urmează: gumă arabică 30 g, zahăr rafinat 30 g, glucoză 5 g, apă distilată 30 cc. Această montare este indicată pentru a impiedica unele retractări celulare, produse prin deshidratare, și care determină pierderea unor detalii.

Rezultate. Metoda este foarte plastică, având cercetări şi pentru impregnări prea puternice i prea slabe, dar cere controlul microscopic al operaţiilor.

§ 1193. — Metoda Ralnanov (după Roschin), pentru impregnarea neurofibrilelor din sistemulnervos central şi periferic, care se aplică pe secţiuni la parafină. 1) Fragmente mici se fixează în alcool 96° 24 părţi, sol. 10% acid azoic 1 parte. Fixarea durează 24 de ore; 2) includere în parafină; 3) secţiunile deparafinate se trec în sol. 10% nitrat de argint, la întuneric şi la 37—40°, timp de 24 de ore; 4) secţiunile se trec apoi după spălare timp de 3-5 minute în sol. *A* borat de sodiu 0,20 g, sufit de sodiu 1 g, apă distilată 25 cc; sol. *B* metol 0,05 g, hidrochinonă 0,13 g, apă distilată 12 cc, sulfat de sodiu cristalizat 1 g. Părţi egale din sol. *A*. şi sol. *B*. Soluţiile *A* şi *B* nu se păstrează decât 4—5 zile; 5) după clătire în apă distilată, secţiunile se trec în sol. 5% tiosulfat de sodiu, timp de 3—5 minute; 6) spălare în apă; 7) deshidratare, clarificare, montare. Se poate face supracolorare cu carmin sau hematoxilină - eozină.

Rezultate. Elementele nervoase se colorează în negru sau în castaniu-închis, celelalte ţesuturi în galben-deschis.

§ 1194. — Metoda Rogers pentru secţiuni la parafină: 1) fixarea pieselor în sol. 10—20% formol, 7 zile, sau în sol. Bouin — acelaş timp; 2) spălare în apă curgătoare, 24 de ore, după fixare în formol. După fixarea în sol. Bouin se vor trece piesele în alcool 70°, schimbat de mai multe ori, pentru a scoate excesul de acid picric; 3) deshidratare, începând cu alcool 80—90°, cu amoniac (III picături la %), câte 24 de ore, şi alcool absolut 2 — 4 ore. Clarificare ulei de cedru sau cloroform. Includere în parafină. Secţiuni de 2—40 μ, lipite pe lamă cu gelatină sau albumină; 4) deparafinare şi hidratare; xilen, alcool absolut, apoi alcool 90° cu 2% amoniac, alcool 80°, apă distilată; 5) impregnare în sol. 40% nitrat de argint, la întuneric, timp de cel puţin 20 de minute (o şedere prelungită în soluţia argentică nu supraimpregnează); 6) spălare rapidă în apă distilată; 7) reducere prin turnarea pe lamă a câtorva picături din sol. 20% formol, timp de 2—5 minute; 8) se varsă apoi pe lamă din soluţia argento-amoniacală (caldă la 30—35°). Se balansează lama pentru a fi acoperită complect de soluţie (soluţia argento - amoniacală preparată ca în metoda Bielschowsky - Gros, cu amoniac în exces 1 picătură la 2 cc şi cu adaus de 4 cc, apă distilată). Control la microscop pentru mersul impregnării. Secţiunile iau o culoare galbenă-brună; 9) clătire în apă distilată. Control la microscop. Dacă secţiunile sunt supraimpregnate se trec în sol. 4% acid acetic până la corectarea impregnării. Din nou clătire în apă distilată; 10) virare în sol. 1/300 clorură de aur 50 cc, acid acetic X picături. Control la microscop; 11) fixare în tiosulfat de sodiu, sol. 5% timp de 5 minute. Secţiunile slab impregnate sunt trecute în sol. 4% acid oxalic; 12) spălare în apă distilată; 13) deshidratare, clarificare, montare.

§ 1195. — Bodian (1936) recomandă o impregnare a secţiunilor la parafină în soluţii cupro-argentice. 1) Fixarea pieselor în sol. 10% formol, apoi trecerea lor, 24 de ore, în sol. 4% hidroxid de amoniu, în alcool 95°; 2) includere în parafină. Secţiuni lipite pe lamă; 3) impregnare în sol. 1% protargol, în care s'au adăogat, după punerea pieselor, 3 g cupru metalic, în granule (cuprul se spală în apă regală, apoi în apă robinet, apoi apă distilată). Durata este de 12—24 de ore, la 37°. Pentru prepararea soluţiei se presară protargolul la suprafaţa apei, fără a se agita. Se prepară în etuvă la 37°; 4) spălare în apă distilată, schimbată de trei ori; 5) reducere timp de 10 minute în hidrochinonă 1 g, sulfit de sodiu 5 g, apă distilată 100 g; 6) spălare în apă distilată, schimbată de trei ori, timp de 5 minute; 7) virare în clorură de aur 1%, timp de 10 minute; 8) spălare în apă distilată, schimbată de trei ori; 9) trecere în sol. 2% acid oxalic. Control microscopic; fibrele nervoase trebue să fie albastre; 10) spălare în apă distilată, schimbată de trei ori; 11) fixare în sol. 5% tiosulfat de sodiu, timp de 5 minute; 12) supracolorare timp de 2—3 minute în albastru anilină 0,10 g, acid oxalic 2 g, acid fosfomolibdic 2 g, apă distilată 300 cc; 13) spălare în apă; 14) deshidratare, clarificare, montare în balsam.

Rezultate. Fibrele nervoase sunt colorate în negru. Celelalte elemente sunt purpurii.

§ 1196 — Metoda de impregnare a secţiunilor la parafină cu nitrat de argint şi protargol (Roschin, 1951): 1) fixare în soluţia preparată extemporaneu din: acid formic 5 cc, acid tricloracetic 5 cc, alcool propilic 25 cc, alcool butilic 65 cc. Durata fixării este de 2—12 ore; 2) alcoolul se schimbă de mai multe ori; 3) includere parafină; 4) secţiunile se trec în sol. 10% nitrat de argint, la 58°, timp de 1 oră; 5) clătire în apă distilată (1/2 minut); 6) trecere în sol. 0,2% protargol, timp de 1 oră; 7) clătire în apă, apoi trecere în amestecul din soluţiile: sol. *A* : sulfit de sodiu 10 g, apă distilată 90 cc; sol *B*: sulfit acid de sodiu 5 g, amidol 1 g, apă distilată 90 cc; sol. *A* 1 parte, sol. *B* 5 părţi. In acest amestec secţiunile stau 1 oră; 8) spălare în apă de robinet, apoi în apă distilată; 9) aurire în sol. 0,1% clorură de aur; 10) spălare în apă distilată şi trecere în sol. 1% amidon, timp de 5 secunde; 11) spălare apă distilată; 12) deshidratare, clarificare, montare.

Coloraţia vitală şi postvitală a sistemului nervos

§ 1197. — Metoda Doghel de colorare cu albastru de metilen. Anumite substanţe colorante, puţin toxice, introduse în organism în soluţii diluate, au proprietatea de a se fixa cu electivitate pe elementele ţesutului nervos, pe celulele nervoase sau pe prelungirile acestora, pe nervii sau terminaţiile nervoase. Corelaţia apare mai ales după expunerea la aer a pieselor, colorantul putându-se transforma într'un leucoderivat,

care nu-şi recapătă culoarea decât prin oxidare în aer liber. Substanţa colorantă cea mai întrebuinţată este albastrul de metilen, care trebue să fie chimic pur. Soluţia se prepară, de preferat, în soluţie clorurată izotonică sau Locke. Concentraţia cea mai utilizată este de 0,1—1‰. Soluţiile mai concentrate au desavantajul de a se fixa şi pe alte celule şi ţesuturi, astfel că selectivitatea coloraţiei este pierdută. Această metodă de coloraţie se numeşte vitală. Calea de introducere a substanţei colorante este deosebită, după animalul în studiu şi după nevoia cercetării. La broască se recomandă a se introduce lichidul colorant în sacul dorsal limfatic, timp de câteva zile, câte 1—2 cc din sol. 1‰, iar câteva momente înainte de sacrificarea animalului se pot introduce 2—3 cc din sol. 1% intracardiac. Aceasta este coloraţia vitală, cu pregătire lentă.

§ 1198. — O altă metodă de colorare vitală este cea rapidă, fără pregătire, când se introduce animalului, prin perfuzie, o cantitate mare din soluţia foarte diluată de colorant (1/10 000 sau şi mai diluată). Injectarea se poate face printr'o canulă introdusă direct în inimă, sau în aortă, sau în altă arteră principală a regiunii ce dorim a cerceta. Inainte de perfuzia lichidului colorant se recomandă să se spele vasele cu soluţie clorurată izotonică. La animalele cu sânge cald, lichidul injectat trebue încălzit la temperatura corpului animalului respectiv. Se injectează soluţia colorantă până ce regiunea de cercetat capătă o coloraţie albastră-clar.

Variaţii de tehnică, în privinţa coloraţiei vitale, sunt determinate de organul de studiat. De exemplu, se recomandă pentru studiul plămânului injectarea unei soluţii de 0,5‰ în trahee, umplându-se întreg plămânul, sau se face injecţia în vasele pulmonare. Se lucrează pe organul nescos din corp, lăsându-se pe loc încă 10 minute. După acest interval de timp se face oxidarea colorantului prin insuflarea cu aer a plămânului, procedându-se la o umflare şi desumflare a organului, cu o frecvenţă de 10—15 ori pe minut, timp de 20—25 de minute.

§ 1199. — **Coloraţia postvitală** constă în aplicarea locală a soluţiei colorante pe piesele proaspete, tăiate în felii subţiri, în care vrem să evidenţiem formaţiunile nervoase. Se recomandă întrebuinţarea de soluţii diluate de albastru de metilen (0,5—1‰) în soluţie clorurată izotonică, la temperatura corpului. Metoda de lucru este foarte simplă. Se iau fragmente subţiri din piese (alteori piese mai complexe, cum ar fi întregul tub digestiv al broaştei, cum recomandă Mc. Clung) şi se pun în sol. 1‰ albastru de metilen, într'un vas larg, pe fundul căruia a fost aşezat un strat de vată îmbibată în colorant. Se umectează continuu cu colorant piesa, dacă o parte a ei este descoperită. Piesele dela animalele cu sânge cald se vor pune în lichidul încălzit şi se vor păstra la termostat la 37°. Durata colorării este în medie de 1 oră, controlându-se sub microscop mersul operaţiei, căutându-se momentul când numai formaţiunile nervoase sunt evidenţiate. Membranele pot fi colorate şi într'un timp mai scurt, 15—20 de minute. Piesele se colorează în albastru dacă contactul cu oxigenul din aer, a fost suficient. Dacă nu s'au colorat vor fi expuse la aer, un timp suficient, 10—30—60 de minute, având grijă ca să nu se usuce. Pentru aceasta vor fi umectate cu sol. 1—10‰ albastru de metilen. Se pot utiliza şi alte metode de oxigenare a ţesuturilor. Această expunere la aer este necesară şi după coloraţia vitală.

§ 1200. — Mai frecvent se întrebuinţează succesiv coloraţia vitală şi cea postvitală, pe aceleaşi piese, adică piesele scoase dela animalul pregătit sau injectat rapid cu colorantul vital sunt trecute şi la coloraţia postvitală, având grijă să nu se producă şi colorarea altor ţesuturi, lucru care cauzează mari greutăţi în cercetarea fibrelor şi terminaţiilor nervoase. O coloraţie reuşită nu evidenţiază decât filetele nervoase, restul ţesuturilor sunt necolorate, apărând în clar. Piesele pot fi supra-colorate cu un colorant de contrast, pentru uşurinţa orientării în structura piesei.

§ 1201. — Piesele colorate vital cu albastru de metilen se decolorează după foarte scurt timp. Pentru păstrarea colorării se procedează la fixarea colorantului, atât după metoda vitală, cât şi după cea postvitală. S'au recomandat mai multe substanţe, dintre care cele mai importante sunt picratul de amoniu şi molibdatul de amoniu. Picratul de amoniu se întrebuinţează în soluţie apoasă concentrată; trebue să fie în cantitate destul de mare, astfel ca să avem un volum de 20—40 de ori mai mare decât al piesei colorate. Durata fixării este de 2—24 de ore, după mărimea piesei. Piesele se trec apoi într'un amestec de glicerină şi sol. picrat de amoniu, în care se face direct şi montarea, în cazul că avem de studiat organe membranoase. Dacă piesele sunt parenchimatoase, sau mai mari, se face în prealabil disocierea în acest lichid, şi apoi montarea, sau se fac secţionări în felii subţiri. Fixatorului i se pot adăuga din soluţie 2% acid osmic 1—2 cc la 100 cc lichid fixator. Şi în acest caz se poate face o supracolorare, pentru nuclei, cu carmin sau picrocarmin.

§ 1202. — Doghel a recomandat ca fixator molibdatul de amoniu, substanţă care este astăzi cea mai utilizată. Se întrebuinţează soluţia de 5—8% în soluţie salină fiziologică. Soluţiile trebue filtrate înainte de întrebuinţare. Cantitatea de soluţie fixatoare trebue să fie totdeauna mare: 20—50 cc pentru piesele mici, 200—300 cc pentru piese mari. Se recomandă ca soluţia să fie cât mai rece la întrebuinţare (2—5°).

§ 1203. — Bethe (1895) recomandă ca fixator amestecul următor: molibdat de amoniu 10 g, apă oxigenată 10 cc, acid clorhidric oficinal X picături, apă distilată 100 cc. Acest fixator complectează colorarea prin oxidarea leucoderivatelor. Se cere ca soluţia să fie rece.

§ 1204 — Smirnov şi Doghel recomandă o dublă fixare: mai întâi în soluţie concentrată de picrat de amoniu, timp de 10—15 minute, apoi în sol. 5—10% molibdat sau fosfomolibdat de amoniu, în apă

distilată. La aceasta se adaugă 1 picătură acid clorhidric oficinal. Pentru a asigura fixarea piesei şi posibilitatea supracolorării se face un amestec în părţi egale între fixatorul colorantului şi sol. 2% acid cromic sau 0,5% acid osmic, care serveşte de fixator al piesei.

§ **1205.** — Cajal recomandă de asemenea o fixare dublă, mai ales pentru piesele care vor fi secţionate după congelare. Se fixează 2—5 ore în sol. picrat de amoniu şi imediat timp de 12—18 ore în molibdat de amoniu.

§ **1206**— După fixare, piesele sunt îndelung spălate în apă distilată: pentru piesele groase, timp de 4—8 ore, pentru piesele membranoase 1—2 ore. Se pot spăla piesele şi în apă curgătoare, cât mai rece. Deshidratarea se face cât mai rapid, în alcool concentrat, alcool absolut dacă este posibil. Deshidratarea se va face la rece în alcool ţinut la ghiaţă şi va dura timp de 1—4 ore. Urmează clarificarea, ce se va face în xilen, pentru piesele membranoase, care apoi vor fi montate în balsam de Canada. Dacă piesele sunt groase, se pot secţiona la microtomul cu congelare, după spălare. Vialleton recomandă să se facă în prealabil o fixare şi întărire a pieselor timp de 24 de ore în soluţia de formol cu clorură de platină: formol 30 cc, apă distilată 100 cc, sol. 1% clorură de platină 5 cc. După secţionare piesele se primesc în alcool absolut, schimbat de două-trei ori. Se pot adăuga în prima baie de alcool câteva picături din sol. 1% clorură de platină. Clarificare în xilen sau în esenţa de origan, şi apoi montare în balsam.

§ **1207.** — Pentru unele piese, neputându-se face secţionarea la ghiaţă, este necesară includerea. Se procedează la o bună şi rapidă deshidratare în alcool absolut, apoi clarificare în ulei de cedru pentru includere (De Castro). In acest lichid piesele pot rămânea un timp mai lung, nepierzând din colorant. Includerea se face rapid, în parafină sau celoidină. Secţiunile pot primi o supracolorare cu carmin alaunat, coşenila sau coloranţi neutri de anilină. Reuşita metodei depinde de viteza cu care facem deshidratarea şi includerea, pentru a nu pierde colorantul fixat pe fibrele nervoase.

§ **1208.** — In Laboratorul de Histologie al Facultăţii de Medicină Bucureşti a dat bune rezultate, în cercetările făcute pe iepuri şi cobai, următoarea conducere a tehnicii: se injectează intraperitoneal din sol. 1% de albastru de metilen, bine filtrată, câte 5 cc timp de 5—6 zile. In ultima zi s'au introdus, înainte de sacrificare, prin vena auriculară 35—40 cc din soluţie 3% în doze de 5 cc la fiecare 5 minute, până ce animalul sucombă (de obicei înainte de a primi doza totală). Piesele, dacă nu sunt colorate, se mai ţin la termostat, în soluţia $1^0/_{00}$, timp de 1 oră. După aceasta sunt expuse la aer timp de 45—60 de minute, umectate fiind cu soluţii slabe de albastru de metilen ($0{,}1^0/_{00}$). Urmează fixarea colorantului în sol. 8% molibdat de amoniu, timp de 24 de ore, apoi spălarea în apă distilată 30—120 de minute şi fixarea pieselor timp de 24 de ore în amestecul: formol comercial 30 cc, sol. 1%

clorură de platină 5 cc, apă distilată 100 cc. In acest fixator piesele pot fi conservate şi un timp mai lung. Se fac secţiuni la microtomul cu congelări. Secţiunile sunt primite în alcool absolut (căruia i se pot adăuga câteva picături din sol. 1% clorură de platină şi apoi se trec secţiunile în alcool absolut pur). Clarificare în esenţă de origan. Montare în balsam.

Rezultate. Fibrele nervoase şi terminaţiile apar colorate în albastru pe un fond clar sau uşor verzui. In cazul că apar colorate şi alte elemente structurale, distincţia elementelor nevoase este uşoară.

§ **1209.** — Vorobiov şi elevii săi Condratiev, Şabadaş, Juravliov) au prelucrat metoda Doghel de coloraţie vitală a sistemului nervos, perfecţionând-o (tehnica Roschin, 1951). S'au introdus o serie de substanţe în soluţia colorantă, ce servesc drept catalizatori sau activatori, şi care întăresc coloraţia. Astfel ar fi: sarea titanoferică, sulfatul de magneziu, sulfatul de fier, peroxidul de magneziu, rezorcina. Deseori se adaugă încă o soluţie colorantă. Condrativ utilizează amestecul: albastru de metilen 1 g, tionină 0,20 g, sare titanoferică 0,50 g, apă fiartă 500 cc. Se evaporează soluţia prin fierbere, până ce pierde 1/6 din volum. Juravliov propune adăugarea de sulfat de magneziu: albastru de metilen 1 g, sulfat de magneziu 10 g, ap. distilată 100 cc. Colorantul se poate combina şi cu soluţia: roşu neutru 1 g, sulfat de magneziu 10 g, apă distilată 100 cc. Se utilizează pentru colorarea ţesuturilor proaspete de om sau animale. Se pun în evidenţă formaţiunile nervoase din inimă, organe urinare (afară de rinichi, trahee, intestin (om, câine, pisică, iepure, viţel).

§ **1210.** — Volanschi adaugă, la soluţii slabe de albastru de metilen, peroxid de magneziu, utilizând formula sol. Ringer (sau Locke) 4000 cc, albastru de metilen 1 g, peroxid de magneziu 5 g. Se disolvă la cald colorantul în solvent, se adaugă apoi peroxidul de magneziu. Se agită şi se filtrează. Soluţia se prepară înainte de întrebuinţare şi se încălzeşte la 37° în momentul injectrii.

§ **1211.** — Roschin recomandă să se injecteze cantităţi mari din soluţia diluată de mai sus, prin aorta abdominală, animalului cloroformizat. Presiunea de injectare trebue să fie apropiată de presiunea arterială a animalului. Trebue injectat, la un câine, 1500—2000 cc lichid colorant, timp de 15—20 de minute. Pentru a asigura circulaţia lichidului colorant se secţionează vena cavă inferioară la intrarea în inimă, pentru organele abdominale, sau vena cavă superioară pentru organele din jumătatea anterioară a corpului. Pentru a se păstra o cantitate de colorant în organe se recomandă ca să se facă ligatura venei eferente înainte de a se injecta ultima cantitate de 150—200 cc.

Se scot organele, care pot fi vizibil colorate, mai ales după ce au stat 1—2 minute la aer liber. Se pot cufunda în colorant pentru 5—6 minute dacă nu sunt colorate. Organele vitare pot fi umplute cu lichid colorant, încălzit la 37—40°.

Rezultate. S'a putut studia inervația diferitelor organe la mamifere, pe pie'e nefixate, mai ales în ceeace privește plexurile nervoase dela suprafață sau mai din profunzime. Cu lupa binoculară se pot urmări plexurile și grupările celulare. Cu obiective puternice pot fi studiate structurile celulare.

§ **1212.** — Șabadaș a dat o metodă de colorație vitală a sistemului nervos cu soluție de albastru de metilen, la care adaugă diferite substanțe cu titlul de activatori, îngrijindu-se ca să obțină un pH optim al soluției, pentru fiecare animal și organ de studiat. Colorația este bazată după autor pe metabolismul tisular, nu pe neurotropismul colorantului. In tehnica recomandată se insistă asupra izotoniei, izotermiei și concentrării optime a ionilor de H. Colorarea se obține atunci când realizăm un anumit pH al soluției pentru fiecare detaliu cercetat. Iată o serie de indicații date în Roschin. Plexurile intramurale ale stomacului de pisică pH=6,98. Plexurile intramurale ale intestinului de pisică pH=5,9. Plexurile nervoase din rinichiul de broscă pH=4,6—5,1. Terminațiile senzitive ale nervilor cerebrospinali pH=6. La lumina acestor date înțelegem dece reușita colorației vitale a fost atât de nesigură, uneori capricioasă în mâna diverșilor cercetători în decursul timpului.

§ **1213.** — Șabadaș recomandă diverși activatori. De exemplu: rezorcina, în formula: albastru de metilen 0,20 g, rezorcină 0,15 g, clorură de sodiu 7,20 g, apă distilată 100 cc. La injectare, soluția trebue să aibă pH=6,26. Autorul a obținut la pisică colorarea în timp de 5—20 de minute a plexurilor din stomac, căi biliare, etc. Alți activatori se găsesc în formula: albastru de metilen 0,30 g, glucoză 1,50 g, tartrat acid de sodiu 0,32 g, clorură de sodiu 7,20 g, apă distilată 1000 cc. Soluția are pH=5,4—5,6. Dacă se adaugă 1,25 g% bromură de magneziu se obține pH=6. Se obțin colorația fibrelor motorii și senzitive cerebrospinale cu acest pH mai ridicat, în timp ce se colorează plexurile subepiteliale din căile urinare, nervii corneei, nervii seroaselor, cu pH mai coborît (Roschin). Se recomandă fixarea colorației în soluție izotonică preparată din: rodhat de amoniu 0,9—1,12%, saturată cu cristale portocalii de picrat de amoniu. Se prepară la 60°, lăsându-se la termostat 12—24 de ore, în timp ce colorate. Fixarea se face în 2—8 ore. Soluția trebue încălzită la 27—30° pentru animale cu sânge cald. Preparatele după spălare și deshidratare se montează în balsam.

§ **1214.** — Roschin recomandă pentru colorarea vitală cu albastru de metilen prepararea de leucobaze din substanțele colorante, din care prepară apoi soluții cu concentrări deosebite, căutând soluția care dă colorația optimă. Pentru prepararea soluției de leucobază de albastru de metilen se procedează astfel: la 100 cc din sol. 0,5% albastru de metilen se adaugă 7 picături din sol. 25% acid clorhidric. La 10 cc din această soluție se adaugă 0,10 g rongalit (de calitate bună). Se încălzește amestecul ușor până ce devine incolor. Aceasta este soluția de leucobază. Nu trebue ca pH-ul soluției să coboare sub 2,41. Dacă calitatea

rongalitului nu este bună, micșorăm uneori cantitatea de acid, de 3—4 ori. Se fac, în borcane de sticlă colorate, o serie de concentrări deosebite de leucobaze. Se pun fragmente din organele de studiat în fiecare vas și se lasă la colorat cel puțin 10 minute. Apoi, la fiecare 5 minute se scoate un fragment dintr'un vas și se cercetează la microscop. Se pune o secțiune din piesă pe lamă, fără a fi acoperită cu lamelă. Se observă apariția colorării; după oxidare, culoarea secțiunii durează $^1/_2$ oră, dacă nu acoperim preparatul cu lamelă; apoi dispare, dacă nu facem fixarea colorației. Astfel se stabilește care este concentrația de colorant cea mai bună. Pentru a fixa colorantul (albastru de metilen sau leucobazele sale) se pun piesele 1—24 de ore (după mărime) în sol. 5—8% molibdat de amoniu. Se pot adăuga 4—6 picături din sol. 1% acid osmic la 100 cc lichid fixator, sau 10 picături din amestecul: sol. saturată apoasă de picrat de amoniu, la care se adaugă I—III picături din sol. 1% acid osmic. Urmează o spălare în apă distilată, schimbată des (1—6 ori). Trecere cât mai rapidă în alcool 95°. Apoi terpineol, schimbat de două ori, xilen. Montare în balsam de Canada.

ORGANELE DE SIMȚ

ORGANUL MIROSULUI

§ **1215.** — Pentru o bună și rapidă fixare a întregii cavități nazale se recomandă pentru piesele care vor fi recoltate dela animale să se introducă lichidul fixator pe cale circulatorie. Dacă se fixează nasul în întregime, în baie fixatoare, se vor deschide larg cavitățile nazale, în zona posterioară pentru a se înlesni pătrunderea lichidului fixator. Trebue studiate, atât regiunea olfactivă, cât și regiunea respiratorie a mucoasei nazale. La om, zona olfactivă este pata galbenă ce se găsește între septul nazal și cornetul din vecinătate, în zona mijlocie a septului. La alte animale, în genere, zona olfactivă se află în regiunea posterosuperioară a cavității nazale. Fixatorii cei mai utilizați sunt amestecurile cu bicromat de potasiu, Susa, Helly, Bouin. După fixare se va face o îngrijită decalcificare cu sol. 5% acid azotic. Pentru cercetări speciale se mai pot face, odată fixarea terminată, și o decolare a mucoasei nazale, în special a zonei olfactive.

§ **1216.** — Epiteliul olfactiv poate fi studiat după metodele histologiei generale. Se pot face disocieri ale epiteliului, prin macerare în alcool 1:3 (2—3 ore), trecându-se apoi în sol. 1% acid osmic, făcându-se în urmă montarea în glicerină. Disocierea se poate face deasemenea direct în sol. 0,1% acid osmic. Acest procedeu de studiu, mai vechi, permite examinarea formelor de celule din epiteliul olfactiv.

§ 1217. — Pentru o vedere generală a epiteliului, ca şi pentru studiul glandelor din corion, se recomandă, după fixări în amestecuri cu bicromat, colorația cu hematoxilină ferică, care evidențiază satisfăcător şi tecile de mielină ale nervilor. Deasemenea colorațiile policrome dau imagini frumoase după fixatori cu baza de sublimat (Zenker, Susa).

§ 1218. — Pentru terminațiile nervoase şi mai ales pentru structura neurofibrilară a celulelor senzoriale vor fi aplicate tehnicile de impregnare argentică Cajal pe bloc sau Bielschowsky-Schultze-Gros pe secțiuni.

§ 1219. — Coloraţia vitală cu albastru de metilen dă deasemenea imagini frumoase. Se poate utiliza una din metodele de colorație vitală recomandate pentru studiul sistemului nervos periferic.

Krause recomandă să se injecteze în carotidă, la oaie, imediat după sacrificare, 200—500 cc din sol. 1% albastru de metilen încălzit la 37°. După 30 de minute se recoltează regiunea nazală, făcându-se secțiuni paralele cu septul nazal, astfel ca piesa să cuprindă cornetul superior. După expunere la aer, se fixează în sol. 8% molibdat de amoniu. După 6 ore se poate detaşa mucoasa olfactivă care se trece în alcool absolut şi se încluzionează în parafină, pentru a avea secțiuni mai fine. Se recomandă a se injecta, la alte animale mai mici, soluții foarte diluate de albastru de metilen 0,06%, în tampon de fosfat de sodiu, monoşi bibazic (după metoda Şabadaş) care asigură o colorație electivă a filetelor nervoase. Se procedează apoi după tehnica coloraţiilor vitale, cu albastru de metilen.

ORGANUL VEDERII

§ 1220. — Pentru a studia în întregime globul ocular se recomandă a se injecta lichidul fixator, în circulație, după ce vasele au fost golite de sânge şi spălate cu soluția Ringer. Această operație se face la animale sau pe cadavru la om cât mai curând după moarte. Se pot injecta: sol. formol, sol. Helly, Bouin, Carnoy, Susa.

La animalele mici se poate detaşa apoi capul şi să se continue fixarea prin punerea sa în lichidul fixator. După aceasta se face extirparea globului ocular, cu multă grijă, pentru a nu fi strivit.

Se poate proceda la enuclearea globului ocular şi imediat după sacrificarea animalului, dacă nu este posibilă injectarea de fixator. Se pune bulbul ocular într'un vas cu o mare cantitate de lichid fixator, pe un strat de vată. Pentru viitoarea orientare se vor face anumite crestături pe globul ocular, pentru a se indica fața sa dorsală şi externă. Deoarece lichidul fixator pătrunde greu prin sclerotică, se poate injecta lichidul în cavitatea posterioară, cu ajutorul unui ac fin, sau se deschide o fereastră în cornee printr'o secțiune făcută cu un brici bine ascuțit.

Un alt lichid fixator care poate fi utilizat este amestecul următor: formol 10 cc, alcool 95° 48 cc, acid picric 1 g, apă distilată 35 cc. Acest

lichid fixează în 2 zile. Fără spălare, se poate trece în alcool 70°, şi apoi, după complectarea deshidratării, se face includerea în celoidină. Retina este bine păstrată.

Includerea în celoidină este cea mai recomandabilă. Se vor face câteva tăieturi în globul ocular pentru a ajuta pătrunderea celoidinei.

Se poate face includerea şi în gelatină, când trebue şi mai mult să se ajute pătrunderea mediului de incluzie, prin tăieturi. Pentru colorarea secțiunilor făcute prin întreg globul ocular se recomandă metodele de colorație generală: hematoxilină-eozină, carmin, sau metodele de colorație policromă.

§ 1221. — **Conjunctiva.** Pentru studiile de histologie generală se recoltează fragmente din mucoasa conjunctivală, tăindu-le cu o foarfecă, şi se utilizează fixatorii şi coloraţiile obişnuite.

§ 1222. — **Cercetarea degenerescenței amiloide din trahom.** Leziunile se găsesc mai ales la nivelul fundurilor de sac superioare; se poate utiliza reacția cu verdele de iod. Fixarea fragmentului în formol, alcool sau sublimat. Includere după una din tehnicile obişnuite. Secțiunile sunt trecute timp de 24—48 de ore în sol. 1/300, apoasă, de verde de iod. Spălare în apă distilată şi montare în glicerină.

Rezultate. Zonele de amiloid se colorează în roşu-violet. Restul țesuturilor sunt colorate în verde.

§ 1223. — **Degenerescența mucoasă a epiteliului din trahom** se cercetează colorând mucusul cu sol. 10% mucicarmin timp de 10 minute. Secțiunile vor fi colorate în prealabil cu hemotoxilină şi galben metanil (sau verde lumină).

Rezultate. Mucina se colorează în roşu, nucleii în violet, fondul în galben sau verde.

§ 1224. — **Corneea.** Pentru studiul histologic al fiecărui strat se pot aplica tehnicile de disociere şi colorare expuse la partea generală a tehnicii de microscopie. Epiteliul anterior corneean poate fi studiat pe secțiuni complecte ale globului ocular, pentru a vedea aranjarea sa în organ, sau pe fragmente de cornee care au fost detaşate dintr'un glob ocular, fixat şi spălat. Pentru a studia celulele componente ale epiteliului anterior, aceste fragmente se pot pune la macerat în alcool 1 : 3 sau în sol. $1^0/_{00}$ de acid osmic. Se spală în apă şi după 24 de ore se complectează disocierea prin comprimare între lamă şi lamelă într'o picătură de glicerină, în care se face şi montarea.

§ 1225. — Țesutul propriu al corneei se poate studia pe piese fixate şi sec ionate, aplicându-se diversele metode de studiu ale țesutului conjunctiv. Dacă vrem să avem elementele structurale (fibrilele şi lamelele) izolate, facem macerarea unui fragment de cornee în soluție de hipermanganat de potasiu sau în apă de var.

§ 1226. — Celulele corneene pot fi puse în evidență prin impregnări argentice. Dacă după ce se cauterizează cu un creion de nitrat de argint epiteliul anterior al corneei la o broască narcotizată, se deta-

şează corneea şi se trece în apă, se pot observa imaginile negative ale celulelor corneene, care apar în clar pe fondul întunecat.

Dacă fragmentul de cornee stă câteva zile în apă, atunci se decolorează fondul şi apar celulele impregnate. Aceste operaţii pot fi făcute pe corneea animalelor mici, care poate fi examinată în întregime. Pentru corneea dela animale mai mari se procedează la fel, însă se fac secţiuni tangenţiale, groase, în cornee, cu un brici.

§ 1227. — Se pot cerceta celulele corneene, ca şi nervii din cornee, prin metodele cu clorură de aur, fie metoda cu clorură de aur şi zeamă de lămâie (§ 1176), fie metoda cu clorură de aur şi acid formic (§ 1177). După ultima metodă se pot face disocieri ale fragmentelor, care se trec apoi prin seria alcoolurilor, xilen şi montare în balsam.

§ 1228. — Krause recomandă o altă metodă pentru celulele corneene dela broască. Se fixează capul broaştei în întregime în amestec Bouin; se fac secţiuni groase cu briciul, din cornee, şi se tratează cu alaun de fier şi apoi hematoxilină Heidenhain (metoda Regaud pentru condriom). Diferenţierea în alaun de fier se face până ce secţiunea devine transparentă. In timpul clarificării în xilol se raclează epiteliul anterior, se montează în balsam. Celulele corneene apar în negru, pe fond clar.

§ 1229. — **Producerea de hialin din arcul senil cornean (geron-toxon).** Această formaţiune patologică constă în producerile de hialin apărute pe membrana Descemet, iris şi coroidă.

Pentru cercetare, se fixează piesa în orice fixator general, afară de acid osmic. Incluzie, secţionare. 1) Secţiunile sunt colorate timp de 10—30 de minute în fuxină fenolată (soluţie saturată de fuxină în sol. 2% fenol); 2) spălare în apă, 2—3 minute; 3) diferenţiere, 1/2 minut, în alcool absolut; 4) trecere timp de 5 minute în colorantul cu formula următoare: verde de iod 1 g, sol. 2% fenol 100 cc; 5) deshidratare în alcool absolut, xilen — balsam neutru.

Rezultate. Hialinul se colorează în roşu-intens, iar nucleii în verde.

§ 1230. — **Irisul, coroida, corpul ciliar.** Se recomandă pentru fixare să se injecteze o soluţie de formol în camera anterioară a ochiului, pe lângă fixarea generală a globului ocular. Pentru a cerceta structura histologică a irisului se recomandă să se studieze ochiul dela animale albinoase (iepure sau şoarece alb). Pentru a scăpa de pigmentul care marchează toată structura se mai poate recurge la una din metodele de îndepărtare a pigmentului, cum este metoda cu clor născând a lui Mayer, sau metoda cu hipoclorit. Metoda cu diafanol poate fi deasemenea întrebuinţată.

Pentru coroidă şi corpul ciliar se recomandă o fixare îngrijită, de preferat prin injecţie şi o includere în celoidină, celoidină-parafină sau gelatină. Secţiunile trebue deasemenea înnălbite, pentru a scăpa de pigment, dacă nu lucrăm cu piese dela animale albinoase. Se aplică tehnicile generale de colorare.

§ 1231. — **Cristalinul.** Fixatori recomandaţi: Susa sau sublimat clorură de platină. Incluzie în celoidină, sau celoidină-parafină. Deseori, din cauza dificultăţilor de incluzionare, vom tăia cristalinul la microtomul cu ghiaţă. Colorarea secţiunilor după tehnica generală; dintre coloraţiile policrome se recomandă azanul. Se pot face şi disocieri pentru studiul elementelor structurale. Alcoolul 1:3, în cantitate mare faţă de piesă (50 cc pentru un fragment de cristalin), dă o bună disociere. După 2 ore desfacem capsula cristalinului şi lăsăm alcoolul să-şi continue acţiunea disociatoare încă 24 de ore. Colorare cu carmin şi complectarea disocierii prin presiune între lamă şi lamelă, într'o picătură de glicerină, în care se face montarea. Lipire îngrijită.

§ 1232. — **Punerea în evidenţă a cristalelor de colesterol, în cristalinul cu cataractă:** 1) secţiuni la ghiaţă din cristalinul cu cataractă; 2) se toarnă câteva picături soluţie Lugol pe secţiune. Apar cristale romboidale, colorate în brun-închis. Dacă după tratarea cu Lugol secţiunile se trec în sol. 30% acid sulfuric, cristalele se colorează în albastru. Dacă secţiunea se tratează cu sol. acid sulfuric, fără tratare cu Lugol, cristalele se colorează în roşu-cărămiziu.

§ 1233. — **Esterii de colesterol din diferite regiuni ale bulbului** ocular se pun în evidenţă pe secţiuni la ghiaţă, din piese fixate în formol sau sublimat (includerea nu se poate face), prin colorarea cu albastru de Nil. 1) Colorarea în sol. saturată apoasă sulfat de albastru de Nil (10—15 minute); 2) spălare cu apă; 3) diferenţiere în sol. 1% acid acetic. Se urmăreşte diferenţierea la microscop până ce secţiunile devin roşcate; 4) spălare prelungită în apă distilată; 5) montare în glicerină neutră.

Rezultate. Colesterolul se colorează în violet; grăsimile neutre în roz; lipoizii şi nucleii în albastru-închis.

§ 1234. — **Retina** poate fi studiată fie pe secţiuni făcute prin tot globul ocular, acestea permiţând o vedere generală a straturilor, cât şi plasarea retinei în globul ocular, sau se pot face preparate din membrană retiniană scoasă din globul ocular şi întinsă pe lamă. Pentru studierea retinei in situ trebue o bună fixare a globului ocular. Metoda injectării de lichide fixatoare în circulaţie dă mai bune rezultate, deoarece învelitorile externe ale ochiului se opun pătrunderii fixatorului dacă fixăm globul ocular după enucleare. Se recomandă să se facă o secţiune ecuatorială prin globul ocular şi să se umple jumătatea posterioară cu fixator. In acest mod suntem siguri de o bună fixare a retinei. Fixatorii utilizabili sunt cei recomandaţi pentru structura generală (formol, Bouin, amestecul Susa), sau cei indicaţi pentru tehnicile speciale ce vom aplica.

§ 1235. — Pentru cercetarea pigmentului din celulele respective, se va studia ochiul de broască dela animale ţinute câteva ore la întuneric, în comparaţie cu cele ţinute la lumina solară, puternică.

Pentru purpura vizuală se ține un animal (broască, iepure, pisică) la întuneric 2 ore, se sacrifică prin decapitare, într'o cameră cu lumină roșie. Se taie o calotă din globul ocular, se cuprinde și cristalinul, și se fixează capul animalului întreg în sol. 2,5 clorură de platină, 12—24 de ore. Apoi se extrage globul ocular, se trece prin seria de alcooluri și benzen, pentru includere la parafină. Secțiuni de 10—20 μ.

Rezultate. Bastonașele prezintă zona lor externă colorată intens în portocaliu.

§ 1236. — Pentru colorarea elementelor nervoase din retină se poate utiliza coloraţia vitală cu albastru de metilen. Doghel a dat o bună metodă. Se deschide, după enucleare, un ochi dela un animal cu sânge cald și se extrage cu grijă retina în bucăți, destul de zdrențuite, având încă resturi de corp vitros pe ea, precum și celule pigmentare. Aceste fragmente se pun pe o placă de sticlă și se stropesc cu soluție de albastru de metilen în soluție fiziologică 1/6—1/8%. După 5 minute se trece fiecare fragment pe o lamă de sticlă, întorcându-se pe cealaltă față, se umectează cu alte picături din soluția colorantă și se pun într'un vas larg, bine închis, la termostat de 37°. Se țin aci 30—40 de minute, având grijă să umectăm suprafața fragmentelor cu soluție colorantă, controlând din timp în timp mersul coloraţiei la microscop. Când colorarea a ajuns la punctul optim, se face fixarea cu o soluție de molibdat de amoniu, direct pe lamă, sau se pun fragmentele membraniforme într'un vas cu lichidul fixator (vezi tehnicile de coloraţie vitală ale sistemului nervos periferic). Retina de broască se poate colora la temperatura laboratorului.

§ 1237. — Pentru impregnările argentice ale elementelor nervoase din retină se pot utiliza metodele de impregnare expuse la tehnica pentru sistemul nervos periferic, cu oarecare adaptări.

Metoda rapidă Golgi se poate aplica după indicațiile lui Ramon y Cajal, care a consacrat retinei numeroase studii. 1) Se pune jumătatea posterioară a globului ocular, după scoaterea corpului vitros, în fixatorul format din: sol. 3% bicromat de potasiu 20 cc, sol. 1% acid osmic 5 cc. Piesa stă în acest fixator 5—6 zile; 2) se usucă cu hârtie de filtru și se trece în: sol. 0,75% nitrat de argint, unde rămâne 24 de ore; 3) piesa se trece din nou în amestecul de bicromat de potasiu și acid osmic dela punctul 1, unde se ține 24—36 de ore; 4) o nouă trecere în sol. 0,75% nitrat de argint timp de 24 de ore. Toate operațiile se pot face la temperatura camerei, sau la 37°, însă la întuneric. Urmează timpii obișnuiți ai tehnicii pentru o rapidă includere în celoidină.

§ 1238. — Pentru punerea în evidență a neurofibrilelor din elementele nervoase, se aplică metoda de impregnare Cajal: 1) se pune retina, extrasă cât de curând după enuclearea ochiului, în sol. 2—5% nitrat de argint, încălzită la 37°, și se păstrează la termostat 37°, timp de 3—5

zile; 2) reducere în amestecul de acid pirogalic 0,70 g, formol 5 cc, apă distilată 50 cc; 3) deshidratare rapidă și includere în parafină.

Diferitele tipuri de celule din structura retinei nu se impregnează în mod egal, fiind variații în raport cu timpii metodei și cu animalul cercetat. Pentru a avea preparate cu evidențierea tuturor straturilor celulare și fibrilare trebue făcute impregnări pe retine provenite dela diverse animale, cercetând și timpii cei mai buni ai duratei impregării.

ORGANUL AUZULUI

§ 1239. — Recoltarea piesei din stânca osului temporal, care să cuprindă urechea internă, constitue timpul cel mai important al tehnicii. Orientarea exactă a direcțiilor în care trebue să se facă secțiunile în piesa osoasă este de mare importanță.

Tehnica pentru organele interne ale auzului la animale mai mari, se compune din mai mulți timpi, astfel ca din întreg osul temporal, detașat dela animal sau cadavrul uman, să obținem micul fragment pe care îl vom pune la fixat și decalcificat, pentru ca apoi să poată fi incluzionat. Mai întâi se taie cu ferestrăul solzul temporal, făcându-se o secțiune paralelă cu tegmen timpani. Apoi se secționează dura mater și nervii care pătrund în orificiul auditiv intern, fără a exercita nicio tracțiune asupra lor. Se face o secțiune perpendiculară pe mijlocul marginii superioare a osului temporal. O altă secțiune de ferestrău se face, paralelă cu ultima și în urma sulcusului endolimfatic.

Fragmentul astfel micșorat se prinde într'un cleşte (menghină) prin cele 2 fețe paralele, și cu un cleşte-pensă ciupitoare de os se rupe din peretele antero-inferior al conductului auditiv extern până aproape de membrana timpanică. O nouă secțiune de ferestrău ridică acoperișul orificiului auditiv extern și rădăcina scuamei, mergând paralel cu membrana timpanică.

In fine se poate micșora fragmentul printr'o secțiune sub membrana timpanică, podeaua urechii medii și bulbul venei jugulare. Se poate deschide canalul semicircular superior cu tăieturi de foarfecă, iar pentru deschiderea melcului se poate face o tăietură triunghiulară, pe marginea antero-superioară a fragmentului.

§ 1240. — Pentru piese provenind dela animalele mai mari se recomandă o fixare mai prelungită în amestecul bicromat, formol, acid acetic, timp de 2—3 săptămâni, a osului temporal, ca apoi după micșorarea fragmentului prin secțiunile recomandate de Panse să se continue încă 2—3 săptâmâni. Decalcificarea se face în sol. 10% acid azotic, schimbate des, și în cantități mari (300—500 cc) timp de 10—14 zile. Spălare prelungită (2 zile) în apă curgătoare și apoi includere în celoidină.

§ 1240 a. — Wittmaak face o primă fixare în formol, acid acetic, apoi o a doua în bicromat de potasiu 2,50 g, acid osmic 0,50, acid acetic 3 g; apă 100 cc, timp de 8 zile, după care începe decalcificarea în acid azotic 3 cc, formol 10 cc, apă distilată 100 cc timp de 2 zile. Se spală piesa prelungit. Se face, după deshidratare, includerea în celoidină. Blocurile de celoidină sunt trecute prin alcool 80% la apă, şi apoi în 5% acid azotic, pentru complectarea decalcificării. In această metodă, acţiunea agentului decalcificant este mai blândă şi structura histologică a urechii interne mai bine păstrată.

§ 1240 b. — Pentru fixarea pieselor care conţin organele auzului dela animale se recomandă şi aici, ca şi la organul văzului, ca să se injecteze lichide fixatoare în circulaţie, după spălarea vaselor cu lichide izotonice (soluţie salină fiziologică). La cadavrele de om se recomandă deasemenea injectarea de lichide fixatoare cât mai curând după moarte, pentru a asigura păstrarea structurilor histologice, până la recoltare. Amestecul bicromat, formol, acid acetic, (sol. 5% bicromat de potasiu 85 părţi, formol 10 părţi, acid acetic 5 părţi), simplu sau diluat 1:2 cu apă distilată, asigură fixarea fragmentelor în 2 zile, la temperatura camerei, sau în 1 zi la termostat 37°. Se poate face apoi decalcificarea cu acid azotic 5—7%; sau această operaţie se poate face după includerea în celoidină, obţinând secţiuni care au suferit mai puţin după urma acidului decalcificant. După fixare, piesele sunt trecute 24 de ore în sol. 4% sulfat de litiu şi apoi tot atâta timp sunt spălate la apă curgătoare.

§ 1240 c. — Krause recomandă pentru o bună fixare a structurilor histologice din urechea internă să se injecteze prin cavitatea nazală şi trompa lui Eustache (prin cateter subţire) o sol. 25% formol, cu 0,5% acid osmic. După 1—2 zile se scoate osul temporal şi se fixează într'un amestec fixator cu acid picric, sublimat şi acid acetic, timp de câteva zile. Apoi se fac secţionările indicate mai sus, pentru micşorarea fragmentului.

§ 1241. — Pentru colorarea secţiunilor se pot utiliza tehnicile de colorare generală, permise de lichidul fixator. In general, coloraţia cu hematoxilină ferică şi o coloraţie de contrast dă destule detalii structurale; deasemenea se pot întrebuinţa şi coloraţiile policrome, care suferă însă din cauza acidului decalcificant. De aceea se recomandă o prelungă spălare după acţiunea acidului azotic.

§ 1242. — Pentru impregnările argentice, de tip Bielschowsky, se recomandă fixarea pieselor în formol 20%. Decalicificarea se face în sol. 5% de acid azotic, timp cât mai scurt (trebue piese mici). Se trec apoi 24 de ore în sulfat de litiu, sol. 4%, după care urmează o spălare în apă curgătoare, timp de câteva ore. O nouă trecere în formol asigură o bună impregnare. Fragmentele pot fi secţionate la microtomul cu ghiaţă, neputându-se însă obţine secţiuni fine şi nici întregi.

PIELEA ŞI FORMAŢIUNILE ANEXE

§ 1243. — In acest capitol vor fi expuse metodele histopatologice cele mai curente pentru studiul pielei, ca organ tegumentar glandular şi de simţ. Vor fi date metodele histologice pentru evidenţierea diferitelor detalii structurale din straturile epidermului, deasemenea mijloacele de a studia dermul şi hipodermul, cu componentele sale. Glandele din piele prezintă puţine date caracteristice care să necesite alte tehnici decât cele indicate în capitolul epiteliilor glandulare. Studiul terminaţiilor nervoase din piele comportă tehnici adaptate după cele pentru sistemul nervos periferic.

Un subcapitol special va fi rezervat tehnicilor pentru studiul fanerelor: firul de păr şi unghia.

1244. — **Recoltarea** tegumentului cutanat uman, pentru studii de histologie, se face din piesele provenite din sălile de chirurgie, putându-se găsi totdeauna la periferia pieselor operatorii destulă piele sănătoasă. Se pot recolta piese şi din sălile de prosectură, curând după deces, sau când cadavrele au fost păstrate în bune condiţii.

Tegumentul cutanat al animalelor prezintă deosebiri structurale mari, dela specie la specie, şi mai ales faţă de cel de om.

După scopul principal al cercetării vom recolta piele din regiunea cea mai indicată: regiunea palmară sau plantară pentru studiul epidermului, regiunea axilară pentru studiul glandelor sudoripare, pielea feţei pentru glandele sebacee, regiunea frontală a pielei capului pentru firele de păr. Pentru peri tactili se va recolta tegumentul buzei dela pisică, cal sau porc.

Din cauza bogăţiei de fibre elastice din derm, pielea după secţionare este foarte retractilă; deaceea se recomandă ca fragmentul de tegument recoltat să fie întins şi fixat cu ace pe o bucată de plută sau carton şi astfel întins să fie pus în lichidul fixator.

§ 1245. — **Fixatorul** ales este în raport cu cercetarea pe care vrem s'o facem, de o bună fixare depinzând o bună colorare a piesei. Fixarea cu formol neutru (10—20%) este cea mai recomandabilă. Deasemenea se pot utiliza şi alte amestecuri fixatoare, cu bază de crom, sublimat sau acid picric (Zenker, Bouin, Maximov, etc.). Nu se recomandă fixarea în alcool, căci tegumentele capătă o duritate care va fi supărătoare la secţionare. De altfel şi în operaţiile pregătitoare pentru includere se va evita o şedere prelungită a piesei în alcool.

§ 1246. — Uneori piesele pot fi secţionate la microtomul cu congelare. De cele mai multe ori, însă, pentru a nu se strica paralelismul straturilor, se cere o includere, recomandându-se celoidina. Fragmentele mici, din care se cer secţiuni subţiri, se pot include şi în parafină. Se mai recomandă şi metoda de includere a lui Peterfi (cu benzoat de metil-celoidină) prin care se obţine o pătrundere mai bună a substanţei de includere în ţesuturile, uneori foarte dense, ale pielei. Este o includere în parafină mai perfectă, care utilizează şi avantajele celoidinei în cursul includerii.

§ 1247. — Includerea în celoidină-parafină este deasemenea de întrebuințat. Pentru tegumentele bogate în apă se va face o includere în gelatină. Dacă includerea nu poate fi făcută curând, este de recomandat ca piesele să rămână sau în soluție de formol 10%, sau după deshidratare să fie păstrate în parafină lichidă, terpineol sau ulei de cedru pentru includere.

§ 1248. — Pentru colorarea generală a secțiunilor de piele se recomandă tehnica de colorare hematoxilină-eozină, sau metodele de colorare policrome. Se poate întrebuința și colorarea cu albastrul policrom, care grație metacromaziei sale dă nuanțări suficiente în colorarea diferitelor straturi.

§ 1249. — **Metoda Pasini** este o colorație policromă, care colorează electiv elementele colagene și elastice ale dermului și nuanțează satisfăcător diferitele detalii ale epidermului. Intrebuințează amestecul colorant albastru apos-orceină, recomandat de Unna. Pentru această metodă sunt necesare următoarele soluțiii: *a)* soluție 2% acid fosfowolframic; *b)* amestecul albastru apos-orceină, care se prepară din: 100 cc soluție 1% albastru apos, orceină 2 g, alcool absolut 100 cc, la care se adaugă după disolvare acid acetic glacial 10 cc, glicerină 40 cc. Se amestecă 2 părți din soluția (*a*) și 1 parte sol. (*b*); *c)* sol. 2% eozină în alcool 50°; *d)* sol. saturată apoasă de fuxină acidă; *e)* glicerină neutră.

Tehnica. Piesele pot fi fixate în formol, Zenker, Bouin, Susa. Includere în parafină sau celoidină. 1) Secțiunile se țin în sol. acid fosfowolframic (*a*), timp de 10 minute; 2) spălare rapidă în apă; 3) colorare în amestecul albastru apos—orceină: (*b*), sol. eozină (*c*) aa 1,50 cc, sol. fuxină acidă 0,20 cc, glicerină neutră 1,25 cc. Secțiunile stau în colorant timp de 20 de minute; 4) spălare în apă distilată; 5) diferențiere în alcool absolut; 6) trecere rapidă (câteva secunde) în soluție de acid wolframic (*a*); 7) deshidratare în alcool absolut, xilen, balsam.

Rezultate. Nucleii, tonofibrilele, keratohialinul sunt colorați în roșu, keratina în roșu-galben, protoplasma albastru-deschis; colagenul albastru-închis; fibrele elastice în roșu-brun.

EPIDERMUL

§ 1250. — Diferitele detalii ale structurilor pielei se studiază cu tehnici mai deosebite. Se studiază piese disociate pentru a cerceta diferite celule izolate, sau celulele descuamate din diferite afecțiuni ale pielei. Alteori cercetăm cu tehnici speciale legătura dintre diferitele straturi, sau celule din același strat.

§ 1251. — Pentru disocierea epidermului se iau fragmente mici de piele și se țin timp de 3—4 ore la temperatura de 40° în soluție saturată apoasă de pancreatină uscată. Prin acțiunea mecanică de răzuire se com-

plectează disocierea epidermului. Se examinează între lamă și lamelă într'un amestec în părți egale de apă, glicerină și alcool 95°. In acest amestec se și păstrează.

§ 1252. — Raporturile dintre celulele epidermului și fibrele interepiteliale pot fi puse în evidență prin numeroase metode.

§ 1253. — Prin impregnări argentice, după metoda Hortega (tanat de argint) se pot pune în evidență membrana bazală, separatoare dintre epiderm și derm, precum și fibrele intraepiteliale și intercelulare.

Prin acid osmic redus prin tanin sau acid pirogalic după metoda Collcsov și modificarea Voronin se pun în evidență spațiile intercelulare. Este o adaptare a metodei de evidențiere a limitelor celulelor endoteliale vasculare.

§ 1254. — Colorația cu violet de dalia pune deasemenea în evidență legăturile intercelulare. 1) Secțiunile sunt colorate timp de 3—5 minute în soluția: violet de dahlia 0,50 g, acid acetic glacial 12 cc, apă distilată 88 cc; 2) spălare în apă; 3) fixarea colorării în sol. 10% tanin, timp de 5 minute; 4) spălare apă; 5) trecere în sol. 1% tartru stibiat; 6) spălare în apă; 7) deshidratare, clarificare în xilen, montare în balsam, alcool. Colorația cu hematoxilină ferică, după metoda Heidenhain, deasemenea poate pune în evidență punțile intercelulare din stratul mucos al lui Malpighi. In același scop, Herzheimer recomandă colorarea secțiunilor cu sol. concentrată de violet de gențiană, în apă anilinată, timp de 10 minute, apoi tratare cu soluția Lugol, timp de 1 minut și diferențiere în ulei anilină-xilen (1:2).

§ 1255. — **Keratohialinul** din stratul granulos se poate pune în evidență prin mai multe metode.

a) O colorare intensă cu hematoxilină Boehmer, urmată de trecere în sol $0{,}5^0/_{00}$ hipermanganat de potasiu timp de 10 secunde, face să apară granulele de keratohialin colorate mai intens în albastru-negru.

b) Colorarea cu violet de crezil, urmată de diferențiere în alcool 90°, până ce țesutul conjunctiv este decolorat, pune în evidență granulele de keratohialin, colorându-le metacromatic în roșu, în timp ce keratina se colorează în violet.

c) In metoda de colorație Pasini granulele se colorează deasemenea în roșu.

§ 1256. — Unna consideră keratohialinul compus din: mezoplastină, globulină acidă și citoză acidă. Mezoplastina intră în constituția granulelor mai mari și se colorează prin hemalaun-hipermanganat de potasiu. Citoza și globulina acidă formează mai mult granulele mici și se colorează cu metoda de colorare verde de metil-pironină.

Rezultate. Granulele de keratohialin se colorează în roșu.

§ 1257. — **Eleidina**, care este un amestec de histonă și colesterol, se cercetează în grosimea epidermului, deasupra stratului granulos, pe secțiuni din tegumentul palmar sau plantar.

Se fac secțiuni la ghiață, din piese fixate în formol sau Bouin. Colorare cu picronigrosină. Sunt necesare următoarele soluții: *a)* sol. saturată apoasă de acid picric; *b)* sol. 1% apoasă de nigrosină. Colorare: 1) se colorează secțiunile în sol. (*a*) timp de 5 minute; 2) spălare în apă; 3) colorare în sol (*b*), timp de 1 minut; 4) spălare în apă; 5) deshidratare în alcool, clarificare în xilen, montare în balsam.

Rezultate. Eleidina se colorează în albastru-închis, în timp ce keratina se colorează în galben-strălucitor.

§ 1258. — Se mai recomandă metode de colorare cu: oranj G metileozină-albastru apos, care pune în evidență eleidina, keratohialinul, keratina și substanțe intermediare. Fixare în formol. Secțiuni la ghiață. Soluțiile colorante sunt următoarele: *a)* sol. apoasă 5% oranj G; *b)* metileozină 1 g, apă distilată 80 cc, alcool 95° 10 cc, glicerină 10 cc; *c)* albastru apos 1 g, apă distilată 80 cc, alcool 95° 10 cc, glicerină 10 cc. Pentru prepararea coloranților (*b*) și (*c*) se disolvă respectivii coloranți la cald, în apă, și după răcire se adaugă amestecul alcool-glicerină. *Colorare* : 1) secțiunile se primesc în apă distilată; 2) colorarea în amestecul (*a*) + (*b*) + (*c*) în proporțiile: 2:3:4 cc (amestecul se poate păstra mai mult timp în sticlă colorată, bine închisă). Timpul colorării este de 5—10 minute; 3) spălare în apă; 4) deshidratare în alcool absolut; 5) clarificare în xilen. Montare în balsam.

Rezultate. Eleidina se colorează în auriu, keratohialinul în violet, substanța intermediară în roșu, keratina în albastru.

§ 1259. — *Keratina* se colorează cu mai toate metodele de colorare pe care le-am cercetat. Metoda Martinotti arată un frumos contrast.

Keratina se poate colora în roșu-închis și printr'o soluție concentrată apoasă de roșu de Congo. Colorația se face în 5—10 minute. Se colorează în prealabil cu hemalaun.

In ultimele straturi celulare ale epidermului, celulele keratinizate sunt încărcate cu grăsime sau cu glicogen. Se pot pune în evidență aceste substanțe cu metodele speciale, respectiv acidul osmic și metoda Best, cu carmin amoniacal.

§ 1260. — Examenul microscopic al scuamelor epidermice este cerut uneori în dermatologie. Se recoltează aceste scuame detașându-le cu o pensă, sau raclând cu o lamă suprafața pielei. Ele sunt constituite din celule cornoase, slab aderente între ele, sau complect disociate. Când sunt mai mari prezintă și celule nucleate, de obicei sunt anucleate. Scuamele seboreice sunt mici și grase. Se complectează, cu două ace, disocierea pe lamă și se face degresarea prin alcool-eter sau cloroform. Aceste substanțe se fixează cu acid acetic 50%. Sunt spălate cu apă și colorate cu: sol. albastru de metilen policrom sau sol. azur II alcalinizat. Se procedează apoi după tehnica generală (spălare în apă, deshidratare, clarificare xilen, montare balsam).

§ 1261. — Pentru înfățișarea generală a dermului și hipodermului, mai ales în ceeace privește raporturile topografice, vom recolta piele din palmă sau talpă. Fixarea se face în formol și includerea în celoidină. Putem obține deslipirea epidermului de derm, pentru a studia înfățișarea dermului la nivelul papilelor, prin macerarea parțială a pielei proaspete în sol. 10% clorură de sodiu, timp de 3—4 zile. Elementele fibrilare conjunctive ale dermului pot fi studiate cu tehnicile speciale ale țesutului conjunctiv.

§ 1262. — Metodele de colorație policromă (Masson, van Gieson), sau una din impregnările argentice ne arată aranjamentul fibrelor în diferitele straturi subepidermice. Fibrele elastice, constituite din elastină, pot fi puse în evidență cu orceină.

§ 1263. — O tehnică pentru evidențierea tinctorială, pe aceeași secțiune, a colagenului, elastinei și elacinei (aceasta fiind o elastină ce și-a pierdut elasticitatea) este următoarea: piesele sunt fixate în alcool și incluse în celoidină, sunt necesare soluțiile: *a)* soluție acidă de orceină: orceină 1 g, acid clorhidric oficin al cc, alcool 70° 100 cc; *b)* soluție albastru policrom (Unna) (se fac soluții separate de albastru de metilen și albastru de toluidină în puțin alcool 70°, care se varsă în sol. apoasă 1% de carbonat de potasiu, se fierbe amestecul 2 minute, amestecând continuu. După răcire se filtrează); *c)* soluție apoasă concentrată de tanin.

Tehnica de colorare. 1) Secțiunile se țin în sol. orceină acidă (*a*), timp de 24 de ore; 2) diferențierea în sol. apoasă 2% acid clorhidric, continuată cu diferențierea în alcool absolut; 3) spălare în apă; 4) colorare cu albastru policrom (*b*), timp de 5 minute; 5) spălare în apă, până nu mai ies urme de colorant; 6) trecere în sol concentrată tanin (*c*), timp de 30 de minute; 7) spălare prelungită în apă; 8) deshidratare în alcool, clarificare în ulei de cedru, montare în balsam.

Rezultate. Colagenul este colorat în brun, elastina în roșu, elacina albastră. Se pot colora și numai colagenul și elacina, utilizând numai albastrul policrom, care colorează elacina în albastru. In soluția de tanin se adaugă câteva picături din sol. 1% oranj care colorează colagenul în galben.

§ 1264. — Pentru fibrele colagene fine se recomandă colorarea cu sol. Giemsa (2—3 picături la 1 cc apă), la 37°, timp de 36—48 de ore. Se spală în apă 1—2 ore; se diferențiază în sol. 1/400 tanin. Uscare (fără alcool). Terpineol-xilen-balsam.

§ 1265. — Elementele celulare din țesutul dermic pot fi văzute prin metodele obișnuite histologice, dar mai ales prin colorarea cu albastru policrom sau cu verde de metil pironină. Prin aceasta din urmă se colorează celulele plasmatice și mastocitele. Celulele plasmatice se pot colora și cu tionină.

§ 1266. — Histiocitele sunt puse în evidență mai ales în piesele experimentale, provenite dela animalele cărora li s'a aplicat colorația vitală cu litiocarmin, sau albastru de pirol.

§ 1267. — Celulele grase sunt colorate cu Sudan III sau Scharlach R, pe secțiuni la ghiață, din piese fixate în formol.

§ 1268. — Tegumentele unor animale sunt foarte bogate în pigment și din această cauză nu pot fi studiate detaliile structurale. Pentru aceasta, secțiunile trebue înălbite înainte de a fi colorate. Se recomandă în acest scop un amestec în părți egale din soluțiile prospăt preparate și filtrate înainte de întrebuințare: sol. 1% acid cromic, sol. 5% clorură de calciu. Se țin secțiunile 10—20 de minute în acest amestec. Dacă se prelungește acțiunea, se produce macerarea secțiunilor. Pe bloc nu se poate face înălbirea, tot din această cauză.

UNGHIA ȘI PĂRUL

§ 1269. — Pentru studiul unghiei se recoltează piese dela feți sau nou născuți, luându-se vârful degetului dela mână sau picior, cu ultima falangă. Piesele recoltate dela adulți se lucrează mai greu.

§ 1270. — Fixarea se face în sol. formol 10—20%, făcându-se apoi decalcificarea în acid azotic 5—10%. Se secționează apoi la ghiață sau mai bine se face întâi incluzia în celoidină. Pentru piesele recoltate dela adult se recomandă trecerea prin diafanol (acid clordioxid acetic), substanță întrebuințată în tehnicile de zoologie pentru înmuierea și clarificarea țesuturilor chitinoase.

Secțiunile de unghie nu pot fi prea subțiri, cu greu obținem sub 15 μ.

Metodele de colorație recomandate pentru epiderm își găsesc aplicare și la studiul unghiei.

Putem studia celulele disociate din unghie. Disocierea se face punând un fragment în hidroxid de potasiu, la cald. După răcire se pune o mică porțiune pe lamă și se complectează disocierea prin presiune, sub o lamelă.

§ 1271. —Pentru studiul firului de păr se recoltează din pielea capului, regiunea frontală, sau din pielea capului de făt de 6—7 luni, pentru desvoltare. Pielea va fi întinsă pe o plută, pentru a nu se retracta, apoi pusă la fixat. Fixarea se face în formol. Includere în celoidină. Rareori putem face secționarea la ghiață. Firele de păr sunt implântate oblic pe suprafața pielei, astfel că orientarea secțiunilor va ține seama de acest fapt. Secțiunile vor fi oblice față de suprafața tegumentului, pentru a avea secțiuni transversale ale firului de păr. In timpul secționării, cuțitul microtomului va ataca blocul dinspre derm spre epiderm, pentru a tăia și tijele firelor de păr.

§ 1272. — Putem obține disocierea celulelor din tijele firelor de păr punându-le la macerat în hidroxid de sodiu sau potasiu 30%, câteva zile la temperatura camerei, sau la cald, câteva ore. Sau încălzim firele de păr în acid sulfuric, într'o sticlă de ceasornic, până ce încep a se îndoi. Se pun mici bucățele din acestea, pe lamă, într'o picătură de apă și prin presiunea lamelei ce o punem deasupra se complectează disocierea.

§ 1273. — Pentru colorarea secțiunilor din pielea capului se utilizează aceleași metode ca și la studiul epidermului: tehnica (§ 1259) pentru keratină: pentru vedere generală se recomandă colorația hematoxilină-eozină sau o colorație policromă.

§ 1274. — Pentru o colorație mai complexă se recomandă metoda cu carmalaun, picroindigocarmin. Soluții colorante: *a)* sol. carmalaun: se disolvă, la cald, 5 g alaun de potasiu în 100 cc apă distilată. Se adaugă 0,50 g acid carminic. După răcire, se filtrează și se adaugă 1 cc formol, ca antiseptic; *b)* sol. picroindigocarmin: 1 g indigocarmin la 300 cc sol. saturată apoasă de acid picric.

Tehnica colorării: 1) secțiunile ce se colorează în carmalaun (*a*), 15 minute; 2) spălare în apă, 2—3 minute (control la microscop: dacă s'a colorat și citoplasma se vor trece secțiunile, câteva minute, în sol. 1% alaun de potasiu, pentru a nu rămânea colorați decât nucleii); 3) colorare în sol (*b*) 5—10 minute; 4) diferențiere în alcool 70°. Deshidratare rapidă, clarificare, montare.

Rezultate. Nucleii roșii, citoplasma verde, mușchii verzi, țesutul conjunctiv albastru, granulele de trihohialin, din celulele tecilor bulbului pilos, roșii.

Pentru colorarea granulelor de trihohialin, din straturile Huxley și Henle ale bulbului pilos, se mai poate întrebuința coloratia următoare: 1) se colorează secțiunile în sol. apoasă 1% roșu Bordeaux, 30 de secunde; 2) spălare cu apă; 3) colorarea nucleilor cu hemalaun, 15 secunde; 4) spălare cu apă; 5) diferențiere în alcool absolut, cu III picături din sol. 3% amoniac, 30 de secunde; 6) deshidratare alcool; clarificare ulei cedru, montare balsam.

Trihohialinul se colorează în roșu-purpuriu (se poate colora cu sol. 1% albastru de Nil, în loc de hemalaun, timp de 5 minute, punându-se mai bine în evidență tecile bulbului pilos).

TERMINAȚIILE NERVOASE IN PIELE

§ 1275. — Pentru corpusculii senzitivi și pentru terminațiile și expansiunile nervoase din piele în genere vor fi recoltate porțiuni de tegument din regiuni speciale, dela om sau animale vârful degetelor dela mână pentru terminațiile intraepidermice și corpusculii Meissner, dermul și hipodermul regiunii palmare pentru corpusculii Vater-Pac-

cini şi Ruffini. Pentru corpusculii Grandry şi Herbst se va recolta ciocul de raţă, iar pentru corpusculii Krause, râtul de porc.

Tehnicile utilizate pentru piele nu sunt decât aplicaţii locale ale metodelor generale pentru studiul terminaţiilor nervoase. Utilizăm metoda coloraţiei vitale cu albastru de metilen, pe piese provenind dela animale cărora li s'au făcut injecţii cu albastru de metilen. Se complectează mai totdeauna coloraţia vitală cu cea postvitală.

§ 1276. — Pentru structura generală a corpusculilor senzitivi, metodele obişnuite de colorare, de exemplu cu hematoxilină-eozină, sau coloraţiile policrome, ne dau date importante asupra aspectului învelişurilor externe şi a celulelor senzoriale. Noel utilizează metodele de coloraţie pentru condriom.

§ 1276 a. — Pentru structura neurofibrilară a terminaţiilor libere şi încapsulate se recomandă tehnicile impregnărilor argentice, Cajal, Boecke sau Bielschowsky-Gros, pe bloc sau pe secţiuni (vezi capitolul respectiv din sistemul nervos periferic).

Impregnările cu clorură de aur au fost utilizate de multă vreme pentru terminaţiile nervoase intraepidermice.

§ 1277. — Schaaf (1938) dă o tehnică modernizată prin accentul ce se pune pe pH-ul soluţiilor utilizate.

Se utilizează piese proaspete (material operator), mici, 2—2,5 mm. Soluţii necesare: *a)* lichid de impregnare. Se fierbe 3 minute într'o eprubetă, în baie de apă, aurum kalicloratum 0,06 cc, sol. tampon (*b*) 4,5 cc, apă distilată 1,5 cc, acid formic 1,5 cc, apoi se răceşte repede sub jet de apă. Soluţia este uşor închisă la culoare. Se prepară la întrebuinţare; *b)* soluţia tampon, cu pH=8,29 conţine sol. 10,7‰ NH_4Cl, în apă distilată 16 părţi, sol. titrimetrică 0,2 N de NH_4OH 1 parte; *c)* sol. 1% acid formic, în apă distilată, prospăt preparată; *d)* soluţia de maturare: preparată la întrebuinţare din sol. 5,4% clorură de aur 39 cc, sol. 1% acid formic 1 cc; *e)* soluţia reductoare preparată din 5 cc din amestecul perhidrol 2 cc, sol. glucoză 5,4% 5,5 cc la care se adaugă sol. glucoză 5,4% 45 cc.

Tehnica : 1) se pun fragmente de piele, cu epidermul în sus, într'un cristalizor cu sol. (*a*) proaspăt preparată (după răcire), la 20—25° şi la întuneric, $2^1/_2$ ore; 2) spălare rapidă în sol. 5,4% glucoză, schimbată de trei ori; 3) se trec piesele într'un cristalizor Petri cu soluţia de maturare. La întuneric 24 de ore. Piesa îşi schimbă culoarea spre violet; 4) reducere în soluţia (*e*), la întuneric 8 ore; 5) se usucă piesele pe hârtie de filtru, apoi 10—12 ore în alcool 50°. Complectarea rapidă a deshidratării şi operaţiile necesare incluzionării în parafină. Se va lucra după metodele riguroase ale impregnărilor.

Rezultate. Filetele nervoase pot fi urmărite în grosimea epidermului, în privinţa structurilor neurofibrilare şi raporturile lor cu celulele Langerhans, în pielea de om sau în lăbuţa de pisică.

METODE DE CERCETARE MICROBIOLOGICĂ IN ŢESUTURI

METODE DE CERCETARE A BACTERIILOR

§ 1278. — In laboratoare bacteriile se cercetează în mod obişnuit în produse patologice, în diferitele secreţii sau în diferitele rezultate ale metabolismului, cum sunt urina şi materiile fecale.

Sunt însă împrejurări când, pentru un diagnostic etiologic precis sau pentru un diagnostic diferenţial şi mai ales în cadrul expertizelor medico-legale, metodele uzuale de cercetare a bacteriilor prin colorarea de frotiuri nu sunt suficiente pentru lămurirea unor probleme de diagnostic. In aceste cazuri, numai căutarea bacteriilor în diferite ţesuturi poate să aducă o precizare a diagnosticului.

Pentru căutarea bacteriilor în ţesuturi este nevoie de metode şi tehnici diferite de acelea pe care le cunoaştem pentru frotiuri.

In acest capitol vor fi trecute numai metodele de largă întrebuinţare şi practic realizabile chiar şi în laboratoarele mai mici şi mai puţin dotate.

§ 1279. — La baza tuturor metodelor de studiu a bacteriilor în ţesuturi stă pe primul plan următorul principiu de fixare. Fragmentele din care se fac preparatele pe care vom căuta bacterii vor fi fixate numai în acele substanţe care au proprietatea de a omorî rapid bacteriile existente în ţesuturi. Aceasta este absolut necesară, pentrucă trebue împied cată desvoltarea bacteriilor pe cadavru. Totodată însă, substanţele fixatoare trebue să întrunească condiţia de a nu altera proprietăţile de colorabilitate ale germenilor.

§ 1280. — Cercetarea bacteriilor în ţesuturi se poate face fie pe secţiuni microscopice necolorate, fie pe secţiuni colorate.

§ 1281. — Cercetarea bacteriilor pe secţiuni necolorate, este o metodă fără importanţă practică curentă, motiv pentru care o menţionăm numai pe scurt. *Tehnica* : secţiunile sunt tratate cu soluţii de acizi puternici sau soluţii alcaline. Acidul acetic este cel mai frecvent întrebuinţat. Faţă de astfel de soluţii, bacteriile sunt foarte rezistente, iar elementele tisulare se distrug. Pe astfel de preparate bacteriile îşi păstrează forma şi dimensiunile lor caracteristice, putând studia în acelaş timp şi modul lor de grupare în ţesuturi. Metoda permite numai o orientare generală, arătând existenţa de bacterii în ţesuturi, fără a putea totdeauna individualiza precis agentul patogen.

§ 1282. — Cercetarea bacteriilor pe secţiuni colorate, necesită câteva observaţii speciale, privind fixarea şi includerea materialului.

§ 1283. — *Fixarea materialului.* Substanţele întrebuinţate ca fixatori şi care să îndeplinească condiţiile menţionate mai sus sunt următoarele: formolul, alcoolul absolut, sublimatul. Folosirea acidului

cromic ca fixator nu permite decât cu foarte mare greutate colorarea bacteriilor. Desvoltarea ciupercilor pe fragmente de organe la care nu s'a făcut o fixare adecvată poate preta de multe ori la greşeli grosolane. In ceea ce priveşte fragmentele fixate în alcool, acestea vor fi lucrate repede sau nu vor fi ţinute prea multă vreme în alcool, deoarece în acest caz bacteriile pot deveni necolorabile sau foarte slab colorabile. In cazul când totuşi trebue să păstrăm aceste frgamente fixate în alcool un timp mai îndelungat, ele vor fi incluse în parafină, blocurile putându-se păstra un număr mare de ani.

§ 1284. — *Secţiunile* pot fi făcute: a) *la congelaţie*. Pentru a face secţiuni la ghiaţă, fragmentele trebue să stea câteva ore în alcool absolut. Secţiunile la ghiaţă au însă desavantajul că sunt prea groase şi nu se întind uniform pe preparat, făcând încreţituri. Pe fragmentele fixate în formol se obţin secţiuni la ghiaţă mai bune, cu condiţia ca în prealabil să fie ţinute puţin timp în alcool.

b) *Includerea la parafină* este cea mai recomandabilă.

Includerea la celoidină nu este recomandabilă, deoarece culorile de anilină specifice pentru colorarea bacteriilor colorează prea intens secţiunile la celoidină, îngreunând examinarea preparatelor.

§ 1285. — Colorarea secţiunilor. Se folosesc aceiaşi coloranţi ca şi pentru frotiuri, cu deosebirea că acţiunea soluţiilor de coloranţi trebue prelungită de două sau trei ori mai mult şi însoţită de încălzire la 37—40°, în scopul de a întări această acţiune. *Diferenţierea* se face prin spălare în apă, alcool sau ulei de anilină, iar pentru unele bacterii cu apă uşor acidulată, alcool sau soluţie iodurată, ca la secţiunile colorate prin metoda Gram. *Clarificare*. După deshidratarea în alcool absolut, secţiunile se trec în xilen.

§ 1286. — Metoda de colorare a secţiunilor nedeparafinate se recomandă atunci când trebue să punem în evidenţă bacteriile ce-şi pierd uşor culoarea în alcool şi uleiuri eterate.

Tehnica : secţiunile la parafină, nedeparafinate, sunt puse într'un vas în care se găseşte soluţia de colorant, încălzită la 40—50° şi se întind pe suprafeţa colorantului până ce devin netede. Secţiunile sunt ţinute astfel un timp variabil şi în dependenţă de metoda folosită. De preferat să se ţină mai mult timp în colorant. La fel se va proceda şi la diferenţiere, decolorare şi recolorare. Odată aceste operaţii terminate, secţiunile se trec cu o spatulă în apă caldă la 40—50°, iar de pe suprafaţa apei sunt trecute pe o lamă, unde sunt foarte bine întinse. Apa este apoi uscată cu hârtie de filtru, după care lamele sunt ţinute 2—3 ore la termostat.

Pentru a grăbi facerea preparatelor, se fixează secţiunile pe lamă prin încălzirea la flacără, după care se deparafinează cu xilen şi se montează.

Acest procedeu dă rezultate bune atunci când se întrebuinţează culorile de anilină.

§ 1287. — Metoda de colorare cu albastrul de metilen Löffler. Prepararea soluţiei colorante se face după următoarea formulă: soluţie alcalină de albastru de metilen 30 cc; hidrat de potasiu 0,001 % 100 cc.

Tehnica de colorare : 1) secţiunile sunt lăsate două ore în soluţia de albastru de metilen; 2) spălare cu apă; 3) diferenţiere timp de 10—30 de secunde într'o soluţie de 0,5—1 % acid acetic; 4) spălare timp de 2—5 minute în alcool 90°; 5) deshidratare în alcool absolut, xilen, balsam.

Durata colorării, ca şi a diferenţierii, variază în strictă dependenţă cu grosimea secţiunii şi felul de colorare al bacteriei. In cazul bacteriilor foarte sensibile la colorant cum sunt bacilul influenţei şi bacilul morvei şi când secţiunile sunt subţiri, nu se mai face diferenţierea.

§ 1288. — Metoda de colorare cu violet de genţiană. Principiul metodei constă în faptul că rezistă la mijloacele de decolorare şi nu alterează forma bacteriilor.

Tehnica: 1) colorare cu o soluţie apoasă de violet de genţiană 2%, timp de 10—15 minute; 2) spălare cu apă; 3) decolorare în alcool. Decolorarea (controlată microscopic) se face atâta timp, până ce secţiunile nu mai degajează niciun nor de colorant; 4) deshidratare în alcool absolut; 5) clarificare în xilen. Montare în balsam.

Avantajul metodei constă în faptul că dă rezultate foarte bune, tocmai pentrucă prin mijloacele de decolorare întrebuinţate nu se alterează forma bacteriilor. Cu excepţia morvei, prin această metodă se pot pune în evidenţă toate celelalte bacterii în ţesuturi. In plus, metoda este extrem de simplă, accesibilă chiar şi laboratoarelor mici şi slab dotate. Nu necesită nicio tehnică complexă şi nici coloranţi inaccesibili posibilităţilor noastre. Credem că ar trebui să devină metoda de cea mai largă întrebuinţare.

§ 1289. — Metoda cu fuxină fenolată diluată. Principiul metodei constă în faptul că diferenţierea se face în alcool slab acidifiat.

Colorarea: 1) secţiunile se pun în colorant (3 picături de fuxină fenolată Ziehl, în 10 cc apă) timp de 30'—1 oră; 2) diferenţiere în alcool slab acidificat (1 parte acid acetic la 1000 părţi alcool absolut); 3) când culoarea iniţială roşu-închis virează în roşu-violet, secţiunile sunt trecute în xilen şi apoi montate în balsam.

§ 1290. — Metoda cu albastru de metilen policrom: varianta Ziehler. Principiul metodei constă în faptul că fiecare element tisular, ca şi bacteriile, se colorează aparte, putându-le individualiza.

Tehnica: 1) fixarea se poate face în orice lichid fixator, se preferă însă formalina. Includerea se face în parafină; 2) colorarea se face timp de 8—24 de ore, în soluţia de orceină slabă (orceină D 0,1 g, acid azotic oficinal 2 cc, alcool 70° 100 cc); 3) spălare rapidă în alcool de 70°, în scopul de a îndepărta excesul de orceină; 4) spălare în apă; 5) colorare în albastru policrom timp de 10—30 de minute şi chiar până la 2 ore. In cazul când preparatele provin din fragmente fixate în

alcool sau sublimat, secţiunile se ţin în albastru policrom cel mult una oră; 6) spălare în apă distilată; 7) diferenţiere de bază în amestecul de glicerină şi eter al lui Unna; 8) spălare în apă; 9) trecere în alcool de 70°, alcool absolut, xilen, balsam.

Rezultate. Prin această metodă, bacteriile se colorează în albastru-închis până la negru. Structurile nucleare se colorează în albastru-închis. Protoplasma se colorează în albastru-verde sau albastru-brun, fibrele elastice în roşu-brun, iar fondul rămâne necolorat.

Această metodă este indicată în special pentru bacteriile greu colorabile, cum sunt: bacilul morvei, tific, streptobacilul, gonococul.

§ 1290. a. — Metoda cu albastru de metilen policrom: varianta Fränkel. Se bazează pe principiul că decolorarea se face sub controlul microscopic. Fixarea fragmentelor se poate face în orice fixator.

Colorarea: 1) colorare în albastru de metilen policrom timp de 15 minute până la 24 de ore. Nu există teama de supracolorare prin prelungirea timpului; 2) spălare timp îndelungat în apă; 3) diferenţiere într'un amestec în părţi egale de 0,5% soluţie apoasă de fuxină acidă sau oranj, 33% soluţie de tanin sau amestec de glicerină şi eter. Decolorarea se va face sub control microscopic. In orice caz, chiar şi atunci când colorarea a durat 24 de ore, decolorarea nu va dura mai mult de câteva minute; 4) spălare în apă de robinet până ce apare culoarea albastră; 5) deshidratare în alcool, xilen, balsam.

Prin această metodă, bacilii se colorează în albastru-închis, iar ţesutul conjunctiv în roşu sau portocaliu.

§ 1291. — Aceleaşi rezultate bune pentru colorarea bacteriilor pe secţiuni se obţin prin colorarea cu soluţia Giemsa şi May-Grünwald, ca şi cu amestecul de verde de metil şi pironină care colorează bacteriile în roşu.

§ 1292. — Metoda coloraţiei Gram în ţesuturi. Tehnica pentru ţesuturi nu diferă deloc principial de aceea pentru frotiuri, deosebindu-se numai prin aceea că timpul de colorare pentru ţesuturi trebue mult prelungit. Se recomandă ca în prealabil secţiunile să fie colorate cu carmin litinat şi să fie recolorate cu brun Bismarck.

§ 1293. — Varianta Weigert: 1) secţiunile necolorate sau colorate în prealabil cu carmin litinat sunt colorate timp de 5—10 minute cu soluţie apoasă de violet de genţiană anilinată sau albastru de metilen anilinat; 2) spălare în apă sau 0,6% soluţie de clorură de sodiu; 3) uscare cu hârtie sugativă, care pe secţiunile de parafină se face după întinderea pe lamă; 4) tratare cu lugol 1—3 minute; 5) uscare perfectă cu hârtie sugativă; 6) decolorare cu ulei de anilină, până când secţiunea devine de culoare galben-verde, sau de culoare roşie, în cazul când secţiunile au fost colorate în prealabil cu carmin litinat; 7) deshidratare.

Rezultate. Bacteriile se colorează în albastru-intens.

In locul soluţiei Lugol, ca diferenţiator, se poate întrebuinţa o soluţie de acid picric 0,5% în apă sau alcool. Această soluţie dă

cu culorile de anilină o combinaţie care poate să fie uşor scoasă din ţesuturi, de alcool. Această combinaţie este păstrată însă de bacteriile Grampozitive.

§ 1294. — Coloraţia cu tionină fenolată. Principiul metodei se bazează pe metacromazia coloraţiei.

Tehnica coloraţiei: 1) secţiunile la parafină se colorează 2—5 minute în soluţie de tionină fenolată (sol. saturată de tionină în alcool de 50° 10 cc şi apă fenicată 1% 100 cc); 2) spălare în apă; 3) decolorare în alcool absolut; 4) se trece în xilol. Montare în balsam. Metoda este folosită pentru toate microorganismele. Bacteriile se colorează în albastru-violet.

§ 1295. — Metoda Schmorl permite punerea în evidenţă a capsulei bacteriei cărbunoase în ţesuturi.

Tehnica: 1) fixare în sublimat şi includere în parafină; 2) colorarea secţiunilor cu tionina fenicată a lui Nicolle. Capsulele bacteriei cărbunoase se colorează metacromatic în roşu, iar bacilii capătă o culoare albăstrie.

Desavantajul metodei constă în decolorarea preparatelor după un timp mai îndelungat.

§ 1296. — Metoda Pittfield permite punerea în evidenţă pe secţiuni a capsulelor bacilului pestei.

Prepararea reactivilor: soluţia I: sol. de alaun concentrată 1 cc şi sol. de violet de genţiană alcoolică şi conc. 10 cc; soluţia II: acid tanic 1 g şi apă distilată 10 cc.

Pentru colorare se prepară extemporaneu un amestec din cele două soluţii de mai sus.

Tehnica: 1) se preferă fixarea în alcool. Secţiunile să fie subţiri; 2) colorare în amestecul extemporaneu. Colorarea se face prin încălzire moderată; 3) spălare cu apă. Uscare, montare în balsam.

§ 1297. — Metoda pentru bacilul rinoscleromului. Fixarea fragmentelor pentru această metodă se face în formol sau formalină. Includerea se face la parafină sau celoidină. Când includerea se face la celoidină, se va avea grijă ca înainte de colorare să se îndepărteze celoidina din secţiuni.

Tehnica: 1) colorare timp de 20 de minute în amestecul albastru de metilen policrom 70 cc şi soluţie apoasă 1% de safranină 30 cc; 2) spălare bine cu apă; 3) îndepărtarea apei cu hârtie de filtru. 4) trecerea într'un amestec de părţi egale de alcool şi xilen, 2 minute; 5) xilen 1 minut, montare în balsam.

Prin această metodă bacilii se colorează în albastru, capsulele în roşu şi massele hialine tot în roşu.

Avantajul metodei este acela de a fi foarte simplă şi posibilă chiar în laboratoare mai puţin utilate şi în plus colorează în acelaş timp în culori diferite corpul bacilului şi capsula acestuia.

§ 1298. — **Metoda pentru bacilul morvei.**

Tehnica: 1) colorare cu soluția de albastru de metilen Löffler 5—10 minute; 2) decolorare timp de 3—5 secunde, în funcție de grosimea secțiunilor, în soluția: apă distilată 10 cc, soluție apoasă concentrată de acid sulfuros 2 pic., soluție 5% de acid oxalic 1 pic.; 3) spălare și deshidratare în alcool absolut; 4) clarificare în xilen și montare în balsam.

§ 1299. — **Metoda Noniewicz pentru bacilul morvei** se bazează tot pe principiul tehnicii cu albastru de metilen Löffler.

Tehnica: 1) colorare timp de 2—5 minute în albastru de metilen Löffler; 2) spălare cu apă distilată; 3) decolorare timp de 2—5 secunde în amestecul: acid acetic 0,5% 75 cc și tropeolină 0,05% sol. apoasă 25 cc; 4) spălare în apă distilată; 5) întinderea secțiunilor pe lamă, uscarea cu sugativă. Această uscare se poate face și în aer și prin încălzire la flacără; 6) clarificare în xilen și montare în balsam.

Rezultate. Bacilii se colorează în albastru-negru.

§ 1300. — **Metodă pentru colorarea bacililor tifici și paratifici.** Are la bază întrebuințarea albastrului de metilen al lui Löffler.

Tehnica: 1) colorare în albastru de metilen Löffler timp de 10—15 minute; 2) spălare timp de 5 secunde într'o soluție apoasă de acid acetic 0,5%; 3) diferențiere în alcool 2—3 minute; 4) deshidratare în alcool absolut, xilen, balsam.

Rezultate : Bacilii se colorează în albastru-negru, iar nucleii țesuturilor se colorează în albastru luminos.

Când avem grupuri numeroase de bacili, se cercetează cu obiective slabe.

§ 1301. — **Metoda pentru bacilul șancrului moale** este aceeași ca pentru bacilul tific, deosebindu-se de aceasta prin variațiile unor timpi din tehnica de colorație.

Tehnica: 1) colorarea se face tot cu albastru de metilen Löffler timp de 15 minute; 2) decolorarea va fi extrem de scurtă în soluția de acid acetic 0,5%; 3) uscare pe hârtie de filtru; 4) se trece un moment în alcool, apoi se usucă și se trece în xilen, după care se montează în balsam.

§ 1302. — **Metoda pentru colorarea gonococului** se bazează pe principiul colorării îndelungate, dat fiind faptul că gonococii se colorează foarte greu în țesuturi.

Colorare: 1) se poate face o colorare îndelungată de 2 ore cu soluția de albastru de metilen Löffler sau cu o soluție de fuxină fenolată diluată 3/10; 2) scurtă introducere în soluția de acid acetic 1/1000; 3) alcool 2 minute; 4) deshidratare în alcool absolut, xilen, balsam.

Se mai pot întrebuința tot cu rezultate bune și alți coloranți ca: albastru de metilen policrom, verdele de metil pironină, ca și metoda de colorare descrisă la începutul acestui capitol pentru secțiunile deparafinate.

* * *

§ 1303. — Făcând o sinteză a aplicării practice a diferitelor metode descrise pentru colorarea bacteriilor în țesuturi, redăm schematic pentru fiecare bacterie metodele de colorarea cu care se poate pune mai bine în evidență.

Metoda cu albastru de metilen Löffler este comună pentru toate bacteriile.

Metoda cu violet de gențiană este comună tuturor bacteriilor cu excepția bacilului morvei.

Brucelele se colorează prin metoda cu albastru de metilen Löffler și metoda cu tionină fenicată a lui Nicolle.

E. coli se colorează cu albastru de metilen Löffler și cu fuxină fenolată.

B. difteric se colorează cu metoda Gram și metoda cu albastru de metilen Löffler.

Vibrionul holeric : prin metoda cu albastru de metilen Löffler și metoda cu tionină fenolată.

B. influenței se colorează prin metoda cu albastru de metilen Löffler sau prin metoda cu fuxină diluată fenicată, ca și prin metoda cu albastru de metilen policrom Fränkel.

B. edemului malign, Gram, albastru de metilen Löffler sau violet de gențiana.

Bacteridia cărbunoasă. Gram modificat de Weigert cu colorarea prealabilă cu carmin litinat, sau metoda cu violet de gențiana. Capsula se colorează prin metoda cu tionină fenolată.

B. pestei se colorează ușor cu toate soluțiile apoase (albastru de metilen Löffler, albastru de metilen policrom).

Capsula microbiană se colorează prin metoda Pittfield.

B. Friedländer se colorează cu metoda Löffler și Friedländer (pentru capsule).

B. piocianic se colorează prin metoda cu albastru de metilen Löffler.

B. rinoscleromului se colorează cu Gram și metoda *cu albastru de metilen policrom și safranină*. Capsulele se colorează cu metoda Friedländer și metoda Schmorl dela cărbune.

B. morvei se colorează prin metoda Löffler și Noniewicz și albastru de metilen policrom Zieler.

B. tetanic se colorează cu Gram și cu metodele obișnuite.

B. tific și paratific prin metoda cu albastru de metilen Löffler și prin metoda cu tionină fenicată Nicolle și albastru policrom Ziehler.

B. șancrului moale prin metoda cu albastru de metilen Löffler.

Gonococii, prin albastru de metilen Löffler sau fuxină fenolată și metoda cu albastru de metilen policrom Zieler.

Diplococul cataral, prin metodele obișnuite.

Pneumococul prin Gram modificat de Weigert, după o prealabilă colorare cu carmin.

Streptococul prin Gram modificat de Weigert.

Stafilococul şi tetragenul se colorează tot prin Gram modificat de Weigert.

Streptobacilul se colorează prin metoda cu albastru de metilen policrom a lui Ziehler.

TEHNICI PENTRU COLORAREA BACILULUI KOCH IN ŢESUTURI

§ 1304. — Uneori, diagnosticul etiologic sau de specificitate al unei secţiuni histopatologice nu este posibil decât dacă pe acea secţiune, prin metode adecvate, reuşim să punem în evidenţă agentul cauzal. Pentru a concretiza acest fapt, este suficient să amintim că de multe ori este imposibil să facem diagnosticul diferenţial etiologic şi histopatologic pe o secţiune microscopică între natura sifilitică sau tuberculoasă a unei leziuni miocardice, altfel decât prin colorarea şi punerea în evidenţă pe secţiune a spirochetei sau bacilului Koch.

Colorarea pe secţiuni histologice a bacililor Koch este de recomandat în cazul leziunilor nefoliculare din sistemul nervos, meningită, abces cerebral, pentru a confirma sau infirma natura cazeoasă a conţinutului, în leziunile de tip tuberculi fibroşi, etc.

Se întâlnesc frecvent anomalii, când cu toată întinderea şi gravitatea leziunilor întâlnite, oricât de meticulos ar fi efectuate metodele de colorație, se pun în evidenţă numai un număr foarte mic de bacili sau nu se pun deloc în evidenţă.

Aceste particularităţi par să fie datorite existenţei formelor granulare ale bacilului Koch, ca şi descoperirii ultravirusului tuberculos.

Colorarea bacilului Koch se bazează pe cele două proprietăţi ale sale, şi anume: de a se colora greu cu coloranţii obişnuiţi şi de a fi acidorezistent.

Menţionăm ca fiind mai importante şi cu rezultate practic mai utile, următoarele metode:

§ 1305. — Metoda Kühne—Borrel. Decolorarea şi diferenţierea se fac cu ajutorul unei soluţii de anilină clorhidrică. *Prepararea soluţiilor*: soluţia de anilină clorhidrică se prepară din anilină clorhidrică 2 g, apă distilată 100 cc.

Soluţia colorantă de fuxină fenolată se prepară după formula următoare: se zdrobeşte într'un mojar 1 g de fuxină bazică cu 10 cc alcool absolut. Se adaugă apoi 5 g de fenol, continuându-se zdrobirea. Se adaugă apoi puţin câte puţin 60 cc apă distilată. Se clăteşte mojarul de două sau trei ori cu încă 40 cc apă distilată rămaşi şi care se vor adăuga la ceilalţi 60 cc, deja vărsaţi în flacon. Se lasă 24 de ore, apoi se filtrează. Acest mod de a prepara soluţia este absolut necesar pentru ca să obţinem o optimă coloraţie a bacilului Koch.

Tehnica: 1) după ce au fost deparafinate şi spălate, secţiunile sunt colorate cu fuxina lui Ziehl pe o platină încălzitoare timp de 10—15 minute, până în momentul când se degajează vapori. Se poate colora şi la rece, într'un tub Borrel timp de 6—10 ore; 2) spălare cu apă; 3) secţiunile sunt tratate rapid şi fără a se ajunge la o decolorare completă, cu soluţia de anilină clorhidrică. Diferenţierea nu trebue să dureze mai mult decât câteva secunde; 4) se spală apoi secţiunea cu alcool absolut până ce culoarea acesteia devine de un roz foarte palid şi apoi se spală cu apă; 5) colorarea nucleilor cu albastru de metilen 1—2 minute; 6) deshidratare, clarificare şi montare.

§ 1306. — Metoda Ivan Bertrand — Medacovici. Principiul acestei metode se bazează pe faptul că, chiar pe un material formolat foarte vechi, bacilii sunt colorabili, iar metoda este de fapt o modificare a tehnicii lui Ehrlich cu fuxină anilinată.

Prepararea soluţiei de fuxină anilinată Ehrlich: se agită puternic 100 cc apă distilată cu 4 cc ulei de anilină, timp de 5 minute. Această emulsie se filtrează pe un filtru umezit cu apă distilată. La filtrat se adaugă 11 cc dintr'o soluţie saturată alcoolică de fuxină. Se agită puternic şi se lasă în repaus câteva ore.

Tehnica de colorare. 1) Fixarea: se preferă fixarea cu formol. Fixarea primitivă sau secundară în lichide care conţin în formula lor acid osmic se recomandă în special pentru cercetările de finețe. Lichidul lui Flemming este un bun fixator, însă fragmentele care trebue fixate vor fi foarte subţiri. Acest fixator permite fixarea produşilor ciroşi ai capsulei bacilare şi ulterior colorarea lor în bune condiţii cu coloranţii cu bază de anilină. Fixarea în lichidul lui Flemming pretinde însă o spălare prelungită de 24 de ore; 2) includere obişnuită şi secţiuni la parafină; 3) se preiau cu o pipetă câţiva cc dela suprafaţa soluţiei de fuxină anilinată Ehrlich, fără a mişca recipientul şi fără a agita lichidul. Se acoperă secţiunea deparafinată cu o cantitate suficientă de colorant. Secţiunea se trece de două-trei ori pe deasupra unei flăcări până ce apar discreţi vaporii; 4) se aruncă colorantul, se lasă lama să se răcească şi se spală cu apă abundentă. Oricare ar fi fixatorul întrebuinţat, preparatul are o culoare intensă, roşie-violacee; 5) diferenţierea prin afundarea preparatului într'un tub cu soluţie de alcool clorhidric (alcool 70° 100 cc, acid clorhidric 3 cc); 6) spălare în apă curentă şi neutralizare într'o soluţie apoasă de carbonat de litiu. Acest timp este deosebit de important pentru păstrarea secţiunilor atât în ceeace priveşte bacilii, cât şi pentru coloraţia citologică. Carbonatul de litiu favorizează coloraţia de fond, prin coloraţiile albastre bazice; 7) spălare suficientă şi colorare a fondului cu soluţia de albastru de metilen (albastru de metilen 3 g, apă distilată 100 cc); 8) spălare şi deshidratare cu alcool. Secţiunea are în ansamblu o culoare albastră şi clară; 9) clarificare în xilen şi montare în balsam de Canada.

Când avem de a face cu un material foarte vechi, fixat în formol, bacilii sunt colorabili, însă nucleii trebue să fie colorați energic cu hemateina acidă a lui Dominici. In acest caz, fondul se colorează cu verde malachit în soluţie apoasă.

Avantajele metodei constau în faptul că colorarea bacililor este posibilă chiar pe un material foarte vechi şi în al doilea rând pentrucă tehnica este aplicabilă pentru orice fixator.

§ 1307. — **Metoda cu fuxină anilinată.** 1) Colorarea secţiunilor cu soluţie de fuxină anilinată proaspătă, timp de 3—5 minute, prin încălzire până la emisiune de vapori. In loc de fuxina anilinată se poate întrebuinţa violetul de genţiana; 2) decolorare cu acid azotic 33%, timp de 1—2 minute; 3) spălare timp de 3—5 minute cu alcool de 60°; 4) recolorare cu albastru de metilen; 5) spălare şi montare.

Este o metodă destul de rapidă, simplă şi cu rezultate frumoase.

§ 1308. — **Metoda Ziehl-Neelsen.** Foloseşte fuxina fenolată în locul fuxinei anilinate.

Tehnica: 1) colorare cu fuxină fenolată timp de 3—5 minute prin încălzire; 2) spălare cu apă; 3) decolorare în acid sulfuric 25% timp de 20—25 de secunde; 4) spălare în alcool de 90°; 5) recolorare în soluţie alcoolică de albastru de metilen 2—3 minute; 6) spălare cu apă, uscare.

Prin această metodă bacilii se colorează în roşu, iar restul în albastru.

§ 1309. — **Metoda cu hematoxilină.** Se deosebeşte de celelalte prin faptul că supracolorarea se face cu hematoxilină.

Tehnica: 1) secţiunile se supracolorează timp de 20—30 de minute cu hematoxilină; 2) spălare cu apă timp de $^1/_2$ oră; 3) colorare cu fuxină fenolată timp de $^1/_2$—1 oră la 37°; 4) decolorare în alcool clorhidric 1 minut; 5) spălare timp de 2—3 minute în alcool de 70°; 6) spălare cu apă; 7) trecere în soluţie de carbonat de litiu diluată 1 la 10, până ce secţiunea apare colorată în albastru; 8) spălare cu apă timp de 5—10 minute; 9) se trece 5 minute în alcool de 90°, alcool absolut, xilen, montare.

Prin această metodă, bacilii se colorează în roşu şi se obţin preparate foarte frumoase.

§ 1310. — După unii autori, fixarea în formalină alterează colorabilitatea bacililor.

§ 1311. — Metodele menţionate mai sus fac posibilă punerea în evidenţă a bacililor Koch, atât în ţesutul nervos, cât şi în celelalte ţesuturi. Pentru sistemul nervos se recomandă însă în special metodele Kühne - Borrel şi Ivan Bertrand - Medacovici.

S'au dat pentru bacilul Koch mai multe metode, pentru a putea corespunde posibilităţilor de materiale ale diferitelor laboratoare, în funcţie de dotarea lor.

COLORAREA BACILILOR LEPROŞI

§ 1312. — Metodele de colorare a bacilului Koch rămân valabile şi pentru cercetarea bacilului lui Hansen, cu excepţia că acesta din urmă se colorează mai repede şi nu este atât de puternic acidorezistent. Astfel se poate întrebuinţa tehnica lui Ivan Bertrand Medacovici cu fuxină anilinată şi chiar metoda Gram. Askanazy a arătat că bacilul lui Hansen se colorează în negru prin metoda de coloraţie Weigert pentru mielină.

Metodele obişnuite şi clasice sunt următoarele:

§ 1313. — **Metoda Unna.** *Tehnica coloraţiei*: 1) fixare în alcool absolut; 2) includere la parafină, secţionare; 3) secţiunile deparafinate se trec timp de 1—2 ore în acid azotic 1‰. Spălare cu apă; 4) colorare timp de 12 ore în soluţia de albastru Victoria (albastru Victoria 1 g, apă timolată (se prepară ca apa de anilină) 100 cc; 5) spălare cu apă şi diferenţiere timp de 5 secunde într'o soluţie de acid azotic 30%; 6) trecere în alcool de 90°, până la complectă decolorare. Spălare cu apă; 7) colorare timp de 10 minute într'o soluţie de safranină 1%. Spălare cu apă şi diferenţiere timp de 5 secunde într'o soluţie de acid azotic 30%; 8) spălare cu alcool absolut până ce nu se mai degajează nicio urmă de colorant; 9) clarificare cu esenţă de bergamote şi montare în balsam.

Prin metoda Unna se pot diferenţia bacilii încă activi, de culoare roşie, de cei necrotici, care se colorează în albastru.

§ 1314. — **Metoda Baumgarten.** Principiul metodei este acela că face posibilă diferenţierea între bacilii leproşi şi bacilii tuberculoşi. Este metoda cea mai recomandabilă, datorită acestei calităţi.

Tehnica : 1) se colorează 10—15 minute cu o soluţie alcoolică de fuxină (5 picături de fuxină alcoolică concentrată, în 5 cc apă); 2) decolorare timp de câteva secunde în amestecul următor: alcool 90%—10 cc, acid azotic 1 cc; 3) spălare cu apă. Fondul se colorează timp de 30 de minute cu o soluţie apoasă de albastru de metilen; 4) spălare, deshidratare, clarificare şi montare.

Bacilii leproşi se colorează în roşu pe un fond albastru, iar bacilii tuberculoşi rămân incolori, permiţând diagnosticul diferenţial.

§ 1315. — **Metoda Russel.** *Tehnica*: 1) secţiunile obţinute prin includere la parafină se colorează timp de 10—30 de minute într'o soluţie concentrată de fuxină în apă fenolată 2%; 2) se spală în apă timp de 3—5 minute; 3) spălare în alcool absolut, o jumătate de minut; 4) diferenţiere şi colorarea timp de 5 minute (în amestecul: verde de iod 1 g, apă fenolată 2%—100 cc); 5) deshidratare în alcool absolut, xilen, montare în balsam.

Metoda este simplă, necesită ingrediente puţine şi dă o frumoasă coloraţie a bacilului leprei.

COLORAREA SPIROCHETELOR

§ 1316. — Diagnosticul diferitelor tipuri de encefalopatii, privite din punct de vedere etiologic, nu este posibil decât prin punerea în evidenţă a spirochetelor în ţesutul nervos.

Oricare ar fi însă metodele şi progresele tehnicii, punerea în evidenţă a treponemelor în ţesutul nervos nu este lipsită uneori de mari greutăţi.

Ţinem să menţionăm că spirochetele se găsesc cu predilecţie în imediata vecinătate a celulelor neuroganglionare şi sunt îndeosebi atinse celulele piramidale din cel de al doilea şi al treilea strat. Cu mult mai rar pot fi puse în evidenţă treponemele în substanţa albă, iar în pia mater sunt excepţionale.

Dăm mai jos câteva din principalele metode cu ajutorul cărora se pot pune în evidenţă spirochetele pe secţiunile histologice din ţesutul nervos.

§ 1317. — Metoda rapidă Manouélian, bazată pe principiul analog cu tehnicile cu argint redus ale lui Cajal.

Tehnica : 1) fragmente foarte subţiri, care nu depăşesc 1 mm grosime, se fixează timp de 1—2 ore în formol 10%. Se mai poate întrebuinţa ca fixator alcoolul 96° sau alcoolul formolat (alcool 96° — 90 cc, formol comercial 10 cc); 2) spălare în trei reprize, cu interval de 10 minute, în care fragmentele sunt trecute în alcool de 90°; 3) spălare în apă distilată într'un flacon cu gât larg, care să conţină 100 cc. Se umple până la jumătate cu apă distilată şi, când se cufundă fragmentele, lichidul se reînnoeşte; 4) impregnare cu ajutorul unei soluţii de nitrat de argint 1% la etuvă, timp de 40 de minute până la 1 oră; 5) după scoaterea din etuvă, piesele se scot încetişor cu o pensă de oţel acoperită cu un strat de parafină fuzibilă la 70°. Piesele sunt puse direct în pirogalol formolat (pirogalol, soluţie apoasă până la 2% — 90 cc, formol 10 cc). Soluţia trebue să fie proaspăt preparată.

Reducerea poate fi terminată în $^1/_2$ oră, dar poate să fie prelungită chiar 48 de ore, fără niciun fel de inconvenient; 6) incluzie rapidă în parafină, care, datorită faptului că fragmentele sunt foarte subţiri, poate fi terminată în mai puţin de 2 ore; 7) deparafinare şi montare în balsam, fără a se mai colora fondul.

Spirochetele apar colorate în negru pe un fond galben-auriu.

§ 1318. — Metoda lentă Manouélian. Este metoda cea mai indicată în cercetările delicate.

Tehnica : 1) fixare în formol 10% timp de 24 de ore; 2) fragmente de 1 mm grosime se pun în alcool de 90° timp de 24 de ore; 3) se spală câteva minute cu apă distilată, până ce fragmentele se cufundă la fundul flaconului; 4) impregnare într'o soluţie de nitrat de argint 1%, timp de 5 zile la etuvă la 37°; 5) spălare în apă distilată timp de 5 minute; 6) reducere timp de 24 de ore, la întuneric şi la temperatura laboratorului, în soluţia de pirogalol formolat (pirogalol 2 g, formol 5 g, apă distilată 100 cc); 7) includere rapidă la parafină şi montare directă a secţiunilor fără a se mai colora fondul.

§ 1319. — Metoda Levaditi. Se bazează pe principiul tuturor metodelor cu argint redus, impregnarea ca şi reducerea trebuind să fie făcute la adăpost de lumină.

Tehnica: 1) fixarea se face pe fragmente subţiri în soluţie de formol 10%. Fragmentele stau în fixator cel puţin 24 de ore. Metoda Levaditi poate să fie aplicată şi pe fragmente fixate în lichidul lui Müller. Se recomandă ca metoda să fie efectuată pe mai multe fragmente în acelaş timp; 2) fragmentele din fixator se trec în alcool de 90°, timp de 24 de ore; 3) trecere în apă distilată; 4) impregnare într'o soluţie de nitrat de argint de 1,5—3% la 37° timp de 3—6 zile; 5) spălare timp de 1—2 ore în apă distilată; 6) reducere în soluţie de acid pirogalic formolat timp de 24—48 de ore, la temperatura laboratorului. Se mai poate întrebuinţa ca lichid reductor amestecul lui Levaditi-Manouélian, care se prepară după următoarea formulă: se amestecă pirogalol 4% 90 cc cu acetonă 10 cc; din această soluţie, în momentul întrebuinţării se iau 10 cc şi se înlocuesc cu piridină pură. Preparatele stau în această soluţie 24—48 de ore la temperatura camerei, ca şi în reductorul de mai sus; 7) spălare 1—2 ore în apă; 8) includere obişnuită la parafină, secţiuni şi montare fără vreo altă coloraţie de fond ulterior, nucleii prezentând un contur net galben-brun.

Primele secţiuni sunt prea puternic colorate şi arse de nitratul de argint. Ca în orice altă metodă de impregnare cu argint redus, există o regiune unde impregnarea este realizată în condiţii optime.

Spirochetele prin această metodă apar colorate în negru-închis, iar fibrele colagene au o tonalitate gălbuie. Există totuşi posibilităţi de confuzie, din cauză că axonii sunt impregnaţi cu argint şi, în cazul când piesele sunt puternic retractate, ei prezintă o serie de ondulaţii care amintesc unele spirochete.

Această metodă este astăzi una din cele mai întrebuinţate, dând rezultate sigure şi bune. Timpii de spălare trebue făcuţi cu multă îngrijire, căci altfel rămân pe preparate multe precipitate şi chiar fibre de ţesut colorate, ceeace îngreunează diagnosticul.

§ 1320. — Metoda Jahnel. Principiul metodei constă în faptul că se împiedică impregnarea neurofibrilelor şi gliofibrilelor, prin tratarea în prealabil a pieselor cu nitrat de uraniu. Metoda reaminteşte de altfel tehnicile cu argint redus ale lui Ramon y Cajal.

Pentru cercetarea spirochetelor pe secţiunile histologice, Jahnel a propus două metode, care pot fi considerate astăzi ca fiind printre cele mai bune în cercetarea treponemei.

§ 1321. — *Varianta I.* 1) Fragmentele prelevate se fixează cel puţin 14 zile în formol 10%; 2) fragmentele mici şi subţiri de 2—4 μ sunt ţinute timp de 1 oră la 37°, într'o soluţie apoasă de 1% nitrat de uraniu. Nitratul de uraniu împiedică impregnarea neuro- şi gliofibrilelor. In caz că nu se reuşeşte, se poate mări concentraţia soluţiei la 2%; 3) spălare timp de 24 de ore în apă distilată; 4) alcool de 96°, unde se ţine timp de 3—8 zile; 5) spălare în apă distilată până la cufundarea fragmentelor; 6) impregnare în nitrat de argint de 0,5%, timp de 5—8

zile, într'un flacon opac şi la etuvă. Este de recomandat a se întrebuinţa un nitrat de argint cristalizat şi chimic pur şi într'un flacon nu se va pune decât un fragment; 7) spălare cu apă distilată la întuneric; 8) reducerea într'o soluţie apoasă de pirogalol 4%, la care se adaugă 5% formol. Reducerea se face într'un flacon opac, la rece, timp de 1—2 zile. Soluţia reductoare va fi preparată totdeauna proaspătă; 9) spălare cu apă distilată; 10) alcooluri succesiv crescânde şi riguros neutre. Includere la parafină, secţiuni de 5μ grosime, montare.

Treponemele apar colorate net negru, pe un fond galben-clar.

§ 1322. — *Varianta II.* 1) Fixare în formol 10% timp de 2 săptămâni; 2) piridină pură, 1—3 zile; 3) spălare prelungită timp de 2—3 zile; 4) se va ţine apoi din nou câteva zile în formol, pentru îndepărtarea piridinei; 5) spălare prelungită. Tratare cu nitrat de uraniu, ca în metoda 1, urmând apoi toţi timpii, ca la aceasta. Tratamentul prealabil cu piridină uşurează impregnarea argentică, dar ea trebue riguros îndepărtată înainte de nitratul de uraniu.

§ 1323. — **Metoda Noguchi.** Principiul metodei se bazează pe aceleaşi elemente ca oricare impregnare argentică, cu reducere în pirogalol.

Tehnica. 1) Material fixat recent în formol; 2) din diferite zone ale cortexului cerebral se prelevează fragmente subţiri care să nu depăşească 5 mm grosime. Secţiunile vor fi perpendiculare pe axul circumvoluţiilor. Fragmentele vor fi ţinute timp de 5 zile la temperatura laboratorului în mordant (formol 10 cc, piridină 10 cc, acetonă 25 cc, alcool absolut 25 cc, apă distilată 30 cc); 3) spălare timp de 24 de ore în apă distilată mereu reînnoită; 4) se cufundă piesele timp de 3 zile în alcool de 96°; 5) spălare din nou în apă distilată mereu reînnoită timp de 24 de ore; 6) impregnare timp de 3 zile într'o soluţie de nitrat de argint 1,5%, în etuvă la 37° sau 5 zile la frig. Impregnarea şi reducerea se vor face la întuneric şi în flacoane opace; 7) spălare 2 ore în apă distilată şi reducere în soluţia de pirogalol formolată (pirogalol soluţie apoasă până la 4% 100 cc, formol 40% 5 cc). Reducerea se poate prelungi 24—48 de ore la temperatura laboratorului; 8) fragmentele bine spălate în apă distilată se trec pentru 24 de ore în alcool de 80°, apoi timp de 3 zile în alcool de 96° reînnoit zilnic şi după aceea se ţin timp de 2 zile în alcool absolut; 9) includere la parafină. Se fac secţiuni de 3—5 microni. Se montează numai secţiunile care prezintă o impregnare optimă.

Această metodă serveşte în general pentru a pune în evidenţă prezenţa spirochetelor în scoarţa cerebrală, în cazurile de paralizie generală progresivă. Prin această metodă, spirochetele apar colorate în negru-închis pe fondul galben-clar al parenchimului nervos.

Accidental se poate întâmpla să se impregneze în plus fibrele nevroglice şi mai ales axonii. Spirochetele vor putea fi în acest caz identificate prin regularitatea turelor lor de spiră.

§ 1324. — **Metoda Hage-Fontana** se bazează pe principiul metodelor cu impregnaţie argentică, întrebuinţându-se frotiurile făcute din serozitate sau suc tisular.

Tehnica: 1) se fixează cu soluţie Rüge (formol 10 cc, acid acetic 1 cc şi apă distilată 100 cc), timp de 1 minut; 2) spălare cu apă de robinet 10 secunde; 3) se introduce în soluţia *A* (acid tanic 5 g, fenol 1 g şi apă distilată 100 cc), care se încălzeşte până la emitere de vapori, nici într'un caz însă peste 55°; 4) se spală 30 de secunde în apă de robinet; 5) peste preparatul încă ud, se pun câteva picături din soluţia *B* (argint nitric 0,25 g şi apă distilată 100 cc); 6) peste lama acoperită cu soluţia de argint se pune o picătură de amoniac. Lama se agită prin înclinare şi în momentul când soluţia a luat o culoare brună se încălzeşte 20—30 de secunde până la o discretă emisiune de vapori; 7) se spală cu apă, se usucă cu hârtie de filtru. Montare. Prin această metodă, spirochetele apar colorate în negru pe un fond galben.

§ 1325. — **Metoda Becker** se bazează pe acelaş principiu ca şi metoda Hage-Fontana, fiind de altfel o modificare a acesteia.

Tehnica: 1) din materialul de cercetat se întind frotiuri subţiri; 2) frotiul se fixează în soluţia Ruge, după ce în prealabil a fost uscat în aer; 3) se spală cu apă 10 secunde; 4) se introduc apoi preparatele timp de jumătate minut în soluţie de tanin 10% cu fenol 1% şi se încălzeşte uşor; 5) spălare cu apă 30 de secunde; 6) se colorează cu fuxină colorată Ziehl, încălzind lama 1/2—3/4 minut; 7) spălare cu apă. Uscare.

Prin această metodă, spirochetele apar colorate în roşu-viu. Unii autori au înlocuit fuxina cu violet cristal. După Schmorl ar fi cea mai bună metodă de colorare pentru *Treponema pallidum.*

§ 1326. — Pentru căutarea spirochetei pe secţiuni, cea mai bună metodă rămâne metoda Levaditi, care permite în acelaş timp individualizarea diferitelor elemente din mediul în care se află spirocheta. Această metodă are în plus avantajul că permite colorarea şi punerea în evidenţă în ţesuturi a tuturor celorlalte spirochete patogene, ca: *Sp. obermeieri,* icterogenă Weil, sp. sclerozei multiple, *Sp. refringens,* etc

METODELE HISTOLOGICE PENTRU DIAGNOSTICUL VIROZELOR

§ 1327. — Spre deosebire de microbi pentru a căror punere în evidenţă se cunosc numeroase metode şi tehnici de laborator, studiul lor morfologic fiind accesibil microscoapelor obişnuite, virusurile, prin structura lor biochimică, ca şi prin dimensiunile lor extrem de mici, nu pot beneficia de metodele de studiu ale bacteriologiei.

Până nu demult, singura metodă de studiu şi de punere în evidenţă era aceea de a realiza boala respectivă experimental pe animale, la care

se treceau pe diferite căi produse ultrafiltrate în care se bănuia existența virusului respectiv.

Aplicarea tehnicilor de histologie în studiul virozelor a dus la descoperiri importante, diferiții corpusculi sau incluzii intranucleare sau intracitoplasmatice constituind expresii morfologice cu care, după părerea virusologilor, se poate diagnostica atât etiologia virotică, cât și tipul de virus care a determinat boala. Este sufi ient să amintim numai de studiul virusului rabic și al virusului hepatitei epidemice (boala lui Botchin), ca să ne dăm seama de serviciile enorme pe care le-au adus metodele histologice pentru studiul virusurilor.

Se dispune astăzi de numeroase tehnici de colorare a diferitelor incluz i, dintre care unele au calitatea că pun în evidență mai multe tipuri de incluzii, iar altele, specifice, pun în evidență corpusculii care sunt caracteristici numai unei anumite categorii de virus, permițând în felul acesta diagnosticul pozitiv și etiologic al virozei respective.

Toate aceste metode au un larg domeniu de aplicare în cercetările experimentale în problema virozelor, însă pe zi ce trece ele se aplică din ce în ce mai intens în patologia umană, ca și cea animală, aducând servicii mari în precizarea diagnosticului și profilaxia multor boli.

In orice caz, în deplin acord cu Ștefan Nicolau, se poate spune că, pentru a face bune experiențe, cu rezultate concludente în studiul virozelor, este necesară o tehnică bună, iar pentru o justă interpretare a lor este neapărat necesară cunoașterea histopatologiei.

§ 1328. — Fixarea. Menționăm că fixarea se face cu ajutorul acelorași fixatori cunoscuți dela histologie și anatomie patologică.

Unul dintre cei mai buni este, după Ștefan Nicolau, fixatorul Dubosq-Brazil (236) pe care autorul îl recomandă mai ales pentru studiul incluziilor virotice în elementele sistemului nervos.

Tehnica fixării. Din organul de cercetat se prelevează felii care să nu depășească o grosime mai mare de 2—3 mm și care se pun în acest fixator timp de 5—8 zile cel puțin. Pot fi însă făcute secțiuni și colorații tot așa de reușite chiar și după ce fragmentele au stat în fixator săptămâni și chiar luni.

După fixare, piesele se includ în parafină.

§ 1329. — Dăm aici tehnica rapidă de includere, propusă de Nicolau și școala sa, care dă de altfel rezultatele cele mai bune.

Timpii de includere: 1) fragmentele se scot din fixator și se spală câteva ore cu apă de robinet; 2) după spălare, piesele se lasă în alcool 96° de seara până dimineața; 3) alcool absolut, o oră până la o oră și jumătate; 4) al doilea alcool absolut, timp de 2 ore; 5) xilen I, o oră până la o oră și jumătate; 6) xilen II, două ore; 7) parafină 56° timp de o oră; 8) parafină 60° (I), timp de o oră; 9) parafină 60° (II) timp de o oră și jumătate.

Blocul se face în acestă a doua parafină.

§ 1330. — Secțiunile. După solidificarea parafinei, blocul se taie la microtom, în secțiuni de 5—10 μ, pentru cazurile în care se pune problema unui diagnostic histopatologic. Pentru studiul incluziilor virotice se recomandă secțiuni până la 5 μ.

§ 1331. — Metodă de includere pentru cercetarea rapidă a incluziilor: 1) fixarea se face în acetonă iodată. Feliile de organe care se pun în acest fixator sunt foarte fine, obișnuit de jumătate de milimetru. Fixarea se face la cald 56° și durează o oră. 2) Alcoolurile. xilenul și parafina se schimbă ca și în metoda precedentă, însă la intervale de numai jumătate de oră.

Avantajul acestei metode constă în faptul că pune repede în evidență incluziile și mai ales corpusculii lui Babeș-Negri, permițând un diagnostic de urgență, care poate fi gata chiar în ziua când a fost recoltat materialul.

Punerea în evidență a corpusculilor elementari pe frotiuri.

§ 1332. — In acest paragraf vor fi indicate câteva metode mai importante de colorare, cu ajutorul cărora se pot pune în evidență corpusculii vaccinali, variolici, zosterieni, variceloși, psitacozici, rabici, mixomatoși, herpetici și alții.

§ 1333. — Metoda Paschen se bazează pe supracolorarea cu cerneala lui Löffler și fuxină fenolată.

Tehnica: 1) frotiul subțire pe lamă, după ce este uscat, se ține timp de 5—10 minute într'un pahar cu apă distilată sau cu soluție fiziologică; 2) uscare la etuvă sau la temperatura camerei; 3) lama se pune timp de 1—24 de ore în alcool absolut, sau timp de 5—15 minute în alcool metilic; 4) uscarea preparatului ca mai sus; 5) pe lamă se varsă cerneala lui Löffler în prealabil bine filtrată și se încălzește timp de 5—7 minute la flacără sau pe platina încălzitoare până la emitere de vapori; 6) se spală rapid cu apă distilată; 7) colorare cu fuxină Ziehl filtrată și nediluată, punându-se la flacără sau pe platină, până ce se degajează vapori; 8) spălare cu apă distilată; 9) în cazul când supracolorarea este prea masivă, spălare rapidă în alcool absolut sau în soluție de tanin 5%, timp de 5 minute; 10) spălare cu apă distilată; 11) uscare la aer sau între foi de hârtie de filtru.

Prin această metodă, corpusculii elementari se colorează în roșu. Tot în roșu se colorează însă și granulațiile nespecifice, ca și inframicrobii. Din această cauză metoda nu poate fi considerată ca fiind electivă.

§ 1334. — Metoda Taniguchi este mai complicată decât a lui Paschen, principiul fiind același.

Prepararea reactivilor. Soluția *A* se prepară din NaOH 0,50 g, CO_3Na_2 0,50 g, apă 10 cc, alcool absolut până la 100 cc. Soluția *B* se prepară din acid sulfuric concentrat 2 cc, apă 10 cc, alcool absolut până la 100 cc. Soluția *C*: se disolvă 5 g de I_2Zn sau I_2Cd într'o soluție de 0,5% iod în alcool absolut.

Tehnica coloraţiei: 1) materialul de cercetat se întinde pe frotiuri foarte subţiri, pe lame bine degresate. Lamele cu frotiurile se usucă la aer cel puţin 48 de ore; 2) preparatul astfel uscat se ţine timp de un minut în soluţia *A*; 3) se spală cu apă; 4) se trece apoi timp de 1 minut în soluţia *B*; 5) se spală apoi cu apă, pentru a elimina substanţa disolvată în acizi sau în alcali; 6) mordansare timp de 1 minut în soluţia *C*; 7) spălare cu apă; 8) mordansare 30 de secunde într'o soluţie apoasă de eozină de 1 ‰; 9) spălare cu apă; 10) colorare timp de câteva secunde în fuxină fenolată Ziehl; 11) spălare cu apă; 12) diferenţiere cu acetonă.

§ 1335. — Metoda Morozov. Principiul metodei se bazează pe impregnarea argentică.

Prepararea soluţiei de argint amoniacal. Această soluţie se prepară în felul următor: se disolvă 5 g nitrat de argint în 100 cc apă distilată. Din această soluţie se scot într'un recipient 20 cc. La cei 80 cc rămaşi se adaugă, picătură cu picătură, o soluţie concentrată de amoniac până când precipitatul brun-negricios care se formează nu se mai disolvă, ci capătă un aspect slab opalescent. Se iau apoi cei 20 cc din soluţia de argint lăsată de o parte şi se adaugă, picătură cu picătură, la soluţia de argint amoniacal, până ce apare o discretă opalescenţă. Reactivul se diluează extemporaneu cu apă distilată în proporţie de 1 la 10. Soluţia este durabilă, trebue însă pusă la adăpost de praf, păstrând-o într'un flacon bine închis şi la întuneric.

Tehnica coloraţiei: 1) se face un frotiu uscat ca în metoda precedentă, care se pune apoi timp de 15 minute în apă distilată; 2) uscare; 3) pe lamă se varsă o picătură din fixatorul Rüge (§ 883), care se ţine 1 minut; 4) spălare cu apă; 5) se pune pe lamă o picătură din reactivul (tanin 5 g, fenol lichefiat 1 cc, apă distilată 100 cc) şi se încălzeşte 30—60 de secunde până la emitere de vapori; 6) se spală apoi 30 de secunde; 7) se pune pe lamă soluţia de nitrat de argint şi se încălzeşte 1—2 minute, până ce preparatul devine brun-închis; 8) se spală cu apă şi apoi se usucă.

Fondul ne apare colorat în galben sau galben-brun, iar corpusculii elementari se colorează în brun-închis sau negru.

Dificultăţile, ca şi desavantajele pe care le prezintă această metodă sunt date de faptul că pe lamă pot apărea granulaţii foarte fine, care pot fi confundate prin aspectul lor cu corpusculii elementari.

Faţă de metodele precedente nu prezintă niciun avantaj în plus.

§ 1336. — Metoda Nicolau întrebuinţează ca substanţă colorantă izamina fenolată.

Tehnica de colorare: frotiurile trebue să fie foarte subţiri şi ele pot să fie puse în colorant atât fixate, cât şi nefixate.

1) Fixarea se face la flacără sau alcool metilic. Pentru a face însă o fixare bună, preparatele vor fi ţinute timp de 10 minute în apă distilată, în scopul de a se îndepărta excesul de albumină şi numai după aceasta se fixează. Frotiul uscat, dar nefixat, va fi ţinut în prealabil în apă

distilată 10 minute; 2) pe preparatul apoi uscat se toarnă colorantul de izamină (albastru de izamină 1 g, fenol 3 g, alcool etilic 10 cc, apă distilată 90 cc). Coloraţia se face la fel ca şi coloraţia cu fuxină fenolată pentru bacilii Koch. Dacă sunt mai multe preparate de colorat, ele pot fi aşezate pe un suport metalic şi acoperite de colorant. Se plimbă apoi pe sub preparate un tampon muiat în alcool şi aprins, încălzirea făcându-se în condiţii satisfăcătoare. Colorantul trebue încălzit până la emitere de vapori, însă fără a fierbe pe lamă; 3) după încălzire se spală repede la robinet.

Avantajul acestei metode este că nu produce niciodată precipitate pe lamă şi dă rezultate mai bune decât metodele menţionate mai sus. În acelaş timp este o metodă extrem de simplă şi cu un domeniu de aplicare larg.

§ 1337. — Metoda Nicolau-Kopciowsca se întrebuinţează la colorarea inframicrobilor voluminoşi care ating şi depăşesc 100 mμ.

Prepararea coloranţilor. Soluţia *A*: fuxină acidă 1,5 g, alcool metilic 33 cc, glicerină 5 cc, sol. acid oxalic 6% 2 cc, apă distilată 60 cc.

Soluţia *B*: albastru de metilen 1,5 g, alcool metilic 33 cc, glicerină 5 cc, sol. acid oxalic 6% 2 cc, apă distilată 60 cc.

Tehnica colorării: 1) se fac secţiuni foarte fine de 2μ; 2) se pune pe lamă colorantul *A* şi se ţine una până la 2 ore; 3) se varsă colorantul şi, fără ca să se spele, lama se acoperă cu colorantul *B* şi se ţine astfel 10—15 minute; 4) se spală cu alcool absolut abundent; 5) xilen, balsam.

Avantajul metodei este de a fi simplă ca tehnică şi permite punerea în evidenţă pe secţiuni a virusului herpetic, zonatos, rabic, varicelos, etc.

Punerea în evidenţă a corpusculilor Babeş-Negri

§ 1338. — Identificarea corpusculilor Babeş-Negri în creierul animalelor suspecte constitue un semn caracteristic pentru diagnosticul de certitudine al turbării.

Tehnica cea mai bună pentru a-i pune în evidenţă este colorarea lor pe secţiuni histologice. Oricare ar fi metoda pe care o întrebuinţăm, se recomandă ca secţiunile să fie făcute pe fragmente prelevate din cornul lui Ammon, unde corpusculii lui Babeş-Negri se întâlnesc în număr mare.

Se poate întrebuinţa orice fixator, dar se preferă alcoolul, sublimatul, Zenker.

Procedeele cele mai bune astăzi sunt tehnica lui Lentz şi impregnarea argentică.

§ 1339. — Metoda Lentz. *Tehnica*: 1) fixare în alcool sau sublimat soluţie saturată; 2) includere obişnuită la parafină; 3) colorarea secţiunilor timp de 1 minut cu soluţie de eozină alcoolică (eozină extra

0,5 g, alcool 60° 100 cc); 4) spălare cu apă; 5) colorare timp de 1 minut în albastru de metilen bazic (albastru de metilen soluție apoasă 30 cc, hidroxid de potasiu 0,04% 100 cc); 6) spălare cu apă și uscare cu hârtie sugătoare; 7) diferențiere în alcool-alcali (30 cc alcool absolut + V picături din soluția 1% de hidrat de sodiu în alcool absolut). Diferențierea se face până ce subsistă o ușoară culoare a eozinei; 8) diferențiere în alcool acetic (alcool absolut 30 cc, acid acetic 50%, 1 picătură). Diferențierea durează până ce celulele nervoase colorate în albastru-palid sunt încă identificabile; 9) spălare rapidă în alcool absolut. Clarificare în xilen și montare în balsam.

Prin această metodă, corpusculii Babeș-Negri sunt colorați în roșu-viu, cu prezența uneori în interiorul lor de granulații albăstrii. Prezența acestor granulații diferențiază ușor corpusculii lui Babeș-Negri de eritrocite.

§ 1340. — Metoda Gallego permite diagnosticul turbării numai în jumătate de oră.

Prepararea soluțiilor. Mordantul: apă distilată 10 cc, acid azotic 1 picătură, perclorură de fer 1 picătură.

Soluția formol-nitrico-ferică pentru virare și fixare: apă distilată 10 cc, formol II picături, acid azotic 1 picătură, perclorură de fer 1 picătură.

Tehnica colorării: 1) fragmente foarte subțiri prelevate din partea mijlocie a cornului lui Ammon se fixează în formol 10%. E de recomandat ca fixarea să se facă la cald timp de 5 minute; 2) spălare rapidă, secțiuni la ghiață de 10—20 μ; 3) mordansare timp de 1 minut în soluția nitro-ferică; 4) fără spălare se colorează direct timp de 5 minute cu fuxină Ziehl acetificată (apă distilată 10 cc, fuxină fenolată Ziehl XV picături, acid acetic 1 g); 5) spălare cu apă și virare și fixare timp de 5 minute în soluția formol-nitrico-ferică; 6) spălare cu apă și colorare timp de 1 minut cu picro-indigocarmin (soluție apoasă de indigocarmin 1% 1 parte, acid picric soluție apoasă saturată 2 părți); 7) spălare cu apă, deshidratare cu alcool de 95° și alcool absolut; 8) clarificare cu xilen fenolat de 5% sau cu esență de bergamote. Montare în balsam.

Protoplasma este albastră-verzuie. Corpusculii lui Babeș-Negri se colorează în verde, cu detalii centrale ușor violete. Corpusculii lui Babeș-Negri prind în același timp fuxina și picro-indigocarminul.

Avantajul metodei lui Gallego este acela că în mai puțin de jumătate de oră se poate pune diagnosticul de certitudine al turbării.

§ 1341. — O altă metodă este următoarea: *Tehnica* : 1) poate fi întrebuințat orice fixator. Includere și secțiuni subțiri la parafină; 2) colorare timp de 5—15 minute în albastru de metilen Löffler puternic diluat cu apă distilată până la transparență; 3) spălare cu apă distilată și diferențiere într'o soluție de tanin 1%. Durata diferențierii este în funcție de intensitatea colorației inițiale. Obișnuit durează 1—5 minute și se controlează la microscop cu un obiectiv slab. In momentul când nucleul apare net se aruncă taninul, se spală bine cu apă și se usucă

cu hârtie sugătoare; 4) trecere rapidă în alcool absolut. Clarificare în xilol și montare în balsam.

Celulele nervoase colorate în albastru conțin în interiorul lor corpusculii Babeș-Negri colorați în roșu-violet; uneori prezintă incluzii de granulații fine.

§ 1342. — Metoda Mann. Este în același timp o admirabilă metodă histologică, ca și un minunat procedeu de a pune în evidență incluziile degenerative pe secțiunile histologice. Metoda întrebuințează sublimatul ca fixator în diferite formule și albastrul de metil în amestecul colorant. Face parte din categoria metodelor generale de colorare a incluziilor.

Prepararea soluțiilor. Colorantul: albastru de metil soluție apoasă de 1% 35 cc, eozină sol. apoasă de 1% 45 cc, apă distilată 100 cc. Diferențiator: alcool absolut 60 cc, NaOH soluție 1% în alcool absolut X picături.

Tehnica : 1) fixare în Bouin sau unul din fixatorii cu sublimat de timp de 1—6 ore, de fragmente subțiri; 2) trecere de mai multe ori în alcool de 90°; 3) includere și secțiuni la parafină; 4) secțiunile se pun timp de 24 de ore în colorantul preparat după formula de mai sus. Să nu se confunde albastrul de metil cu albastrul de metilen. Albastrul de metil întrebuințat trebue să fie în întregime insolubil în alcool absolut; 5) diferențiere în soluția alcool absolut — sodă caustică; 6)spălare abundentă în alcool absolut pentru a îndepărta alcalii; 7) neutralizare prin trecerea secțiunilor timp de 2—3 minute în apă ușor acetificată; 8) deshidratare în alcool absolut, xilen și montare în balsam. Nucleii și nucleolii cu detaliile lor de cromatină apar colorați în albastru. Incluziile oxifile cum sunt corpusculii lui Babeș-Negri și ai lui Joest-Dengen apar colorate în roșu, oricare ar fi topografia lor intracitoplasmatică sau intranucleară. In grosimea corpusculilor se poate observa frecvent un reticul sau granulații albăstrii.

Prin această metodă se pot colora și corpusculii lui Guarnieri, ai vaccinei. Fondul preparatului se colorează în albastru, ca cerul. Metoda dă rezultate foarte bune putând fi efectuată chiar și de tehnicieni cu mai puțină rutină.

METODE DE COLORARE PENTRU CIUPERCI

§ 1343. — De multe ori datele clinice și elementele obișnuite de laborator nu pot să ne dea diagnosticul etiologic al unei leziuni. Acesta nu este uneori posibil, nici chiar prin examenul anatomopatologic făcut cu tehnicile obișnuite. Pentru a pune în evidență agentul patogen al unor boli determinate de ciuperci este nevoie ca, în afară de tehnicile obișnuite, pentru o mai precisă elucidare a diagnosticului, să apelăm la metode speciale și caracteristice pentru ciuperci.

§ 1344. — Metoda pentru Actinomyces. Se bazează pe o îmbinare între colorarea cu violet de gențiană și picrocarminul lui Weigert.

Tehnica : 1) secțiunile se colorează timp de 10—15 minute în violet de gențiană anilinată ușor; 2) se scurge colorantul și fără spălare se trece direct în picrocarminul lui Weigert, unde rămân 5—10 minute (se amestecă carmin o parte, soluție de amoniac o parte și apă distilată 50 părți. La acest amestec se adaugă picătură cu picătură acid picric, agitând sticla până când precipitatul format nu se mai disolvă); 3) spălare cu apă mai mult timp; 4) deshidratare în alcool. Această deshidratare se face până ce secțiunile capătă culoarea galbenă-roșie; 5) se trece apoi în ulei de origan. Montare în balsam.

Prin această metodă, care dă rezultate bune în cazul actinomicozei umane, miceliile se colorează în albastru, măciucile în roșu, iar nucleii celulelor în galben-roșu.

§ 1345. — Metoda van Birch-Hirschfeld permite colorarea particulară a fiecărui element, permițând individualizarea lor.

Tehnica : 1) secțiunile se colorează în prealabil cu hematoxilină sau carmin litinat; 2) se colorează apoi timp de 5 minute într'o soluție de cristal violet 2% moderat încălzită: 3) trecere timp de $^1/_2$—1 minut într'o soluție alcoolică de acid picric 0 5%; 4) deshidratare în alcool absolut până ce preparatul capătă o nuanță verde-albastru. Deshidratarea durează cam $^1/_2$ oră; 5) diferențiere în ulei de origan (de mai multe ori întrebuințat); 6) xilen, balsam.

§ 1345 a. — Pentru colorarea co pului măciucilor, secțiunile se trec timp de 5 minute într'o soluție de fuxină fenolată, înainte de a fi trecute în soluția de violet cristal. Din fuxina fenolată se trec în alcool și de aci se continuă colorația, începând dela punctul 2.

§ 1345 b. — Fuxina fenolată poate fi înlocuită în această metodă prin fuxină anilinată sau safranină anilinată.

Prin această metodă, miceliul apare colorat în albastru, partea marginală a măciucilor în galben și după tratare cu fuxină fenolată măciucile se colorează în roșu.

§ 1346. — Pentru *Actinomyces* poate fi folosită și metoda obișnuită cu hematoxilină — eozină atunci când miceliile sunt Gram negative. Cu rezultate destul de bune pot fi întrebuințate metodele van Gieson, Biondi-Heidenhain, iar pentru descrierea miceliului poate fi întrebuințată metoda Levaditi. Nu se dispune încă de o metodă perfectă, care să permită diferențierea tuturor detaliilor.

§ 1347. — Metoda Gram Weigert modificată. Principiul metodei este acelaș ca și al metodei Gram-Weigert întrebuințată la căutarea bacteriilor.

Tehnica este adoptată pentru cercetarea ciupercilor. 1) Secțiunile se colorează după metoda Gram Weigert (§ 1293); 2) din ulei de anilină acestea se trec în alcool timp de 3 minute; 3) colorare într'o soluție de fuxină acidă timp de 3 minute. Soluția se prepară punând 3 picături de soluție concentrată în 15 cc apă; 4) spălare cu apă timp de 2 minute; 5) deshidratare în alcool, xilen, balsam.

Prin această metodă miceliile se colorează în albastru-închis, măciucile în roșu iar nucleii nu se colorează.

Metoda are avantajul de a fi scurtă, putând avea în cel mult o oră preparatele gata de examinat la microscop.

§ 1348. — Metoda Romanovschi-Giemsa adaptată pentru colorarea mucegaiurilor.

1) Secțiunile se lasă în soluție Giemsa 1 la 10. timp de 12—24 de ore; 2) spălare în apă distilată și diferențiere rapidă în acid acetic sol. 0 25%; 3) spălare îndelungată în apă, deshidratare în alcool, xilen, balsam.

Prin această metodă miceliile se colorează în albastru-palid, organele de fructificare se colorează în roșu, nucleii în albastru-închis, iar protoplasma în roșu.

METODE DE COLORARE A PARAZIȚILOR IN ȚESUTURI

§ 1349. — Sunt întrebuințate frecvent pentru punerea în evidență a protozoarelor parazite, a plasmodiului malaric și a tripanosomelor.

In ceeace privește protozoarele parazite, din cauza fragilității lor și a faptului că se distrug foarte repede, se recomandă o deosebită atenție la fixarea fragmentelor din care vor fi făcute secțiunile.

§ 1350. — *Fixatori.* Se folosesc obișnuit: sublimatul, fixatorul lui Flemming și Carnoy și mai ales amestecul de sublimat alcool (2 părți sublimat la o parte alcool absolut). Concentrația lichidelor fixatoare nu trebue să fie variabilă, mai ales în ceeace privește alcoolul. Formele tinere ale protozoarelor sunt acelea care se distrug mai repede din cauza variațiilor de concentrații.

Colorarea. Se folosește în acest scop: hematoxilina ferică Heidenhain, safranina, tionina, violetul de gențiana, amestecul Biondi-Heidenhain, hematoxilină-eozină. Metoda Romanovschi dă deasemenea rezultate bune.

§ 1351. — Metoda Romanovschi-Giemsa modificată pentru protozoare parazite. Prepararea soluțiilor necesare:

Soluția *A* : soluție Lugol 3 cc și alcool 70° 100 cc.

Prepararea apei neutre. O apă absolut neutră se obține astfel: într'o sticlă picătoare se pun câteva cristale incolore de hematoxilină, care se disolvă în alcool 96°. Intr'o sticlă de reactivi se pun aproximativ 6 cc din apa de cercetat și 2—3 picături din soluția de hematoxilină, după care se agită. Dacă apa rămâne timp de 5 minute gălbuie sau fără culoare, se pun în apă atâtea picături din soluția de carbonat de sodiu sau kaliu 1%, până ce o nouă probă de apă capătă până în 5 minute și nu înainte de 1 minut o culoare violetă-clar. Apa a devenit foarte slab alcalină.

Colorarea: 1) fixare în sublimat alcool (13 0) 48 de ore schimbat la 24 de ore; 2) spălare scurtă în apă și 5—10 minute se trece în soluția

Lugol; 3) se spală rapid în apă şi după aceea se trece timp de 10 minute într'o soluţie de tiosulfat de sodiu 0,5%, până ce secţiunea pierde culoarea galbenă dată de Lugol; 4) spălare în apă curentă timp de 5 minute 5) colorare în soluţie Giemsa recent diluată. Colorarea durează cel puţin 12 ore. Dilu,ia se face: 4 picături de colorant la 1 cc apă. După $^1/_2$ oră, soluţia de colorant se reînnoeşte; 6) după scoaterea din colorant se spală în apă şi se introduce apoi în bateria de acetonă + xilen după cum urmează: *a)* acetonă 95 cc + xilen 5 cc; *b)* acetonă 70 cc + xilen 30 cc; *c)* acetonă 30 cc + xilen.

Această metodă este valabilă şi pentru secţiuni cu următoarele modificări:

1. Piesele vor fi trecute din fixator cu ajutorul unei pense de os. Ele nu vor avea mai mult de 1 μ grosime.

2. După colorare spălarea se face cu apă absolut neutră.

§ 1352. — Metodă pentru punerea în evidenţă a plasmodiului malaric. Se bazează pe acelaş principiu ca şi metoda Romanovschi-Giemsa, cu deosebirea că se preferă fixarea în alcool.

Tehnica : 1) fixare de preferinţă în alcool; 2) secţiuni foarte subţiri la parafină; 3) colorare timp de 24 de ore în soluţie Giemsa diluată 1 picătură la 1 cc apă tamponată p H = 7,2; 4) spălare în apă; 5) diferenţiere rapidă în acid acetic 0,5%, până ce secţiunea devine roz; 6) spălare în apă distilată, uscare; 7) diferenţiere rapidă în alcool absolut până ce apare culoarea albastră; 8) uscare, xilen, balsam.

Prin această metodă, plasmodiul apare colorat în albastru, cromatina în roşu luminos, nucleii roşu-închis, eritrocitele în roz.

Se pot obţine rezultate şi după fixarea cu formalină sau soluţie acidă de sublimat. In acest caz, ca metode de coloraţie se poate recomanda hematoxilină, eozină sau sol. concentrată de albastru de metilen Löffler.

§ 1353. — La fel se pot obţine rezultate bune colorând secţiunile nedeparafinate în soluţie Giemsa nediluată şi încălzită 1—2 ore. Decolorarea în acest caz se poate face şi cu amoniac 0,5% în loc de acid acetic. Spălarea se face cu apă caldă.

Pentru punerea în evidenţă pe secţiuni a tripanosomelor leishmaniei şi cnidosporidiilor se obţin rezultate foarte bune cu metodele Romanovschi-Giemsa şi hematoxilină ferică. Ca fixatori se pot folosi alcoolul sublimat, sol. Flemming sau alcool.

CULTURI DE ŢESUTURI

§ 1354. — Cultura ţesuturilor, denumită de unii autori *explantare in vitro*, este o metodă dinamică de cercetare în biologie (Maximov, Timofeevschi, Hlopin, Avrorov, Harrison, Burrows, Carrel).

Ea permite studiul comportării ţesuturilor vii scoase dintr'un organism şi cultivate într'un mediu adecvat în afara organismului din care provine şi a influenţelor acestuia. Este aplicabilă în morfologia şi fiziologia normală şi patologică, în bacteriologie, chimie biologică, farmacologie, etc.

§ 1355. — *Explantarea in vivo* poate fi executată, fie prin grefarea fragmentelor de ţesut sau a organelor în întregime dela un animal altui animal (homografă, heterografă) prin inserţia subcutanată, intraperitoneală, intratisulară, fie prin implantarea fragmentelor de ţesut pe membrana corio-alantoidă.

§ 1356. — *Tehnica culturii ţesuturilor in vitro*. Prezentăm tehnica clasică necesară oricărui începător, care apoi poate fi modificată şi adaptată după condiţiile locale şi după scopul urmărit. Este util ca operatorul să fie familiarizat cu tehnicile practicate în laboratoarele de bacteriologie.

§ 1357. — Materialul necesar.

A. Instrumentar şi recipiente.

Instrumente chirurgicale obişnuite: bisturie, foarfeci drepte şi curbe, pense anatomice, pense hemostatice. Pense cu cioc larg (Ehrlich) pentru a apuca lamelele. Câteva bisturie de iridectomie. Mai multe perechi de forfecuţe drepte şi curbe şi câteva pensete fine din trusa oftalmologică.

Siringi Luer de 20 cc, 10 cc, şi 5 cc; variate şi numeroase ace pentru preluarea sângelui.

Pipete Pasteur capilare.

Tuburi de centrifugă.

Cutii Petri de 10 şi 20 cm diametru şi câteva de 15 cm diametru.

Cristalizatoare mici de 5 cm diametru şi mari de 12 cm diametru. Pahare obişnuite (Borrel) de 5 cm diametru; pahare conice (150 cc); flacoane Erlenmeyer mici, mari şi mijlocii; lame scobite sau simple; lamele de 24/24 mm de bună calitate.

Eprubete normale (17/17 mm) şi largi de 4 cm.

Fiole de 1 cc şi 2 cc.

Stelaj (rame) pentru lame.

Hârtie de ambalaj; hârtie neagră.

Măşti, vată, comprese sterile.

Flacoane Kitasato pentru filtrat la vid.

Aparat Seitz pentru filtrare cu plăci de asbest E. K.

Dispozitiv pentru determinarea pH-ului.

Centrifugă (electrică).

Baie cu nisip (electrică).

Microscop, termostat pentru 37—38°, frigorifer.

Autoclav etuvă.

Reactivi şi coloranţi obişnuiţi de laborator, în plus substanţe chimice (pro analysi) NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $NaHCO_3$, NaH_2PO_4,

glucoză în flacoane originale, heparină, acid osmic. Amestec de: parafină (40%), ceară de albine (40%) şi vaselină (20%).

§ 1358. — Unii autori întrebuinţează pentru cultivarea ţesuturilor, în loc de lame scobite, diferite recipiente speciale sau adecvate (flacoane Carrel, flacoane Borrel, cutii Marinescu şi Minea, cutii Gabrizschewsky, inelele lui Baraski şi altele). Pentru bunul mers al culturilor, modelul recipientului nu are nicio importanţă. Fiecare cercetător îşi potriveşte recipientele după posibilitatea laboratorului şi după scopul urmărit. Pentru culturi de scurtă durată se recomandă metoda culturilor pe lamelă, iar pentru culturi de lungă durată se recomandă metoda culturilor în flacoane speciale.

§ 1359. — La prepararea materialului (recipiente, instrumente, produse biologice) trebue ţinut strict seama de curăţenia riguroasă a obiectelor, de asepsia bacteriologică şi de asepsia chimică. Sticlăria ambalată în hârtie se sterilizează la autoclav sau pupinel. Instrumentele se fierb sau se ţin în alcool.

MEDIILE DE CULTURĂ

§ 1360. — Cercetările au arătat că elementele tisulare pot prolifera în condiţiile cele mai simple şi foarte depărtate de ambianţa lor naturală. In general, mediul de cultură care satisface condiţiile fizico-chimice necesare proliferării celulelor se compune din trei elemente: *a)* plasma sanguină sau limfatică, care prin reţeaua de fibrină ce o conţine serveşte drept suport material pentru celulele noi crescute în cultură; *b)* soluţia salină menţine umiditatea mediului, concentraţia ionică, apoi diluează plasma şi extractul tisular; şi *c)* trefone sau substanţe excitoformatoare, care stimulează proliferarea chiar a celulelor adulte.

Celulele noi crescute îşi trag elementul nutritiv mai mult din substanţele care provin din autoliza celulelor fragmentului tisular însămânţat.

Variind cantitatea şi calitatea celor trei componente ale mediului, unii cercetători au preparat diferite medii speciale mai adecvate scopului propus (creşterea mai bogată, creşterea mai prelungită, metabolismul mai scăzut, ori mai ridicat, etc.). Pentru culturile de durată este nevoie de mediu cu substrat solid (plasmă); pentru culturi de scurtă durată se poate întrebuinţa un mediu lichid, cum este mediul Locke-Lewis, compus din soluţii saline şi bulion.

§ 1361. — **Prepararea plasmei.** Există mai multe procedee de preparare a plasmei; cel mai practic este procedeul lui Crăciun, care are la bază întrebuinţarea heparinei in vitro. Animalul preferat pentru recoltarea plasmei este găina, deşi cobaiul, iepurele, broasca, şoarecele şi alte animale de laborator pot fi sângerate deasemenea în acest

scop. Puncţia cardiacă este procedeul de alegere, deşi sângele poate fi recoltat şi prin puncţia unei artere ori vene mari.

Preparative preliminare. Inainte de a începe sângerarea trebue să ne asigurăm de materialul necesar şi de animalul respectiv.

Materialul necesar: seringă Luer (din toate materialele vor exista rezerve) de 20 cc montată cu un ac gros, lung de 45 mm (pentru găină), ascuţit, cu bizou scurt, sterilizată la căldură uscată într'un tub larg şi răcită la frigorifer înainte de întrebuinţare.

Două tuburi de centrifugă.

Fiole cu heparină $1^0/_{00}$ în soluţie salină fiziologică.

Ghiaţă pisată sau zăpadă într'un cristalizor în care se răcesc tuburile de centrifugă.

Câmp operator de 30/50 cm cu fereastră de 15 cm.

Pipetă cu bulă.

Fiole de 1 cc.

§ 1362. — Animalul care va servi pentru prepararea plasmei trebue să fie tânăr; el va fi ţinut la post 24 de ore (poate bea apă). Toată regiunea subaxilară stângă a găinei este curăţată de pene, iar la celelalte animale regiunea precordială smulsă de păr. Regiunile respective bine înmuiate cu alcool. Pentru puncţia cardiacă, găina curăţată de pene în regiunea axilară este culcată pe partea dreaptă. Ajutorul apasă peste aripa stângă răsfrântă cu mâna dreaptă, iar gâtul găinii este susţinut între degetul arătător şi cel mijlociu, trăgând capul puţin îndărăt. Mâna stângă a ajutorului ţine strâns amândouă picioarele. Cele două mâini ale ajutorului trag uşor în direcţii opuse, imprimând găinii o uşoară întindere, care o imobilizează şi fixează poziţia splanhnelor (fig. 18) Găina în întregime şi mâinile ajutorului se acoperă cu un câmp steril.

Operatorul, cu mâinile spălate cu alcool, aranjează penele sub marginile ferestrei câmpului operator şi le umectează bine cu alcool.

Locul de puncţie este uşor de găsit dacă ţinem seama de linia preaxilară, care trece înaintea capului humerusului aripii răsfrânte spre caudal şi de perpendiculara ce o ridicăm din baza sternului (palpare cu vârful degetului mare stâng) spre linia preaxilară; la un centimetru mai caudal de punctul de întâlnire al acestor două linii se găseşte locul unde trebue făcută puncţia (fig. 18).

In timpul cât operatorul umectează cu alcool toată regiunea subaxilară şi reperează locul puncţiei, găina, fiind acoperită în întregime cu câmpul operator, se obişnueşte cu noua ei situaţie şi stă liniştită, ceeace permite sângerarea fără anestezie.

După ce seringa a fost încărcată cu 1 cc de heparină, operatorul, cu mâna stângă, reperează din noul locul puncţiei, iar cu mâna dreaptă, ţinând seringa vertical, introduce acul, simţind rând pe rând rezistenţa pielei, a muşchiului pectoral, apoi a unui gol (cavitatea pleurală) şi în sfârşit rezistenţa muşchiului cardiac şi contracţiile miocardului. In seringă apare sânge care, la fiecare contracţie a inimii, se acumulează

şi ridică pistonul de sticlă al seringii. Dacă sângele nu apare în seringă, deşi se simt contracţiile inimii, atunci acul trebue înfundat sau retras, pentru ca bizoul să fie la nivelul cavităţii ventriculare. Sângele trebue lăsat să vină în seringă dela sine. El nu trebue aspirat; prin aspiraţie se pot trage din sucul pulmonar substanţe tromboplastice, care vor

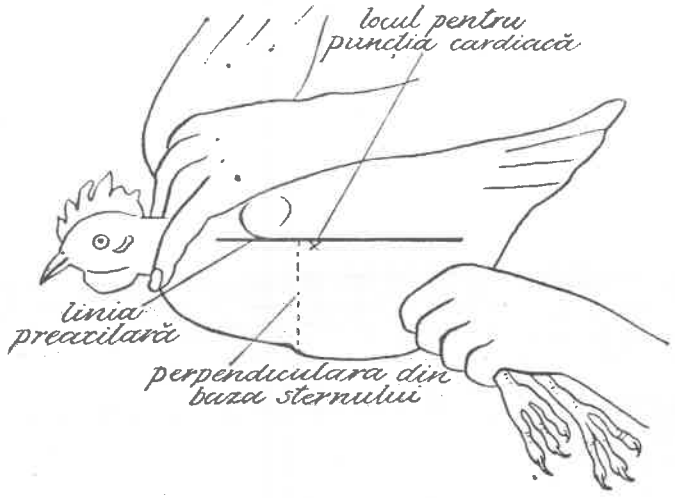


Fig. 18. — Punctia inimii la găină.

coagula sângele din seringă. La fiecare sângerare se pot scoate la găină 20 cc de sânge. Seringa se retrage repede şi se răsuceşte de câteva ori, pentru ca sângele să se amestece cu heparina. Apoi sângele se trece în tuburile de centrifugă (răcite). Se centrifughează 12 minute la 3000 ture. Plasma bună are culoare citrină-clară; ea este prelevată cu pipeta cu bulă şi distribuită câte $^1/_2$ cc în fiole. Controlul sterilităţii plasmei se face prin însămânţare pe geloză şi bulion şi prin ţinerea fiolelor 24 de ore la termostat. A doua zi se controlează fiecare fiolă pentru a vedea dacă plasma a rămas limpede. Se păstrează la rece. Plasma bine preparată nu coagulează spontan, iar pusă în contact cu substanţe tromboplastice din ţesuturi (în culturi) coagulează în 1—2 minute; ea poate fi întrebuinţată timp îndelungat (3—5 luni). Plasma de găină dă chiagul prea dur, deaceea se recomandă să fie amestecată cu ser, cu plasmă de mamifer sau cu soluţie salină.

§ 1363. — Scoaterea sângelui la cobai, iepure, câine, etc, se face exact ca la orice sângerare în bacteriologie, cu diferenţa că seringa este în prealabil încărcată cu heparină. Se alege acul potrivit pentru animalul întrebuinţat. Cantitatea de heparină trasă în seringă trebue dinainte calculată la cantitatea sângelui scos, în aşa fel încât în diluaţia finală concentraţia

heparinei să fie 1 g la 10 000 pentru sânge de mamifere şi 1/20 000 până la 1/40 000 pentru sânge de găină (deci 1 cc heparină $1^0/_{00}$ pentru 9 cc sânge de mamifer şi 1 cc heparină $1^0/_{00}$ pentru 19 cc sânge de găină). Pierderea inevitabilă a unei mici cantităţi de heparină prin acul larg (gros) în timpul poziţiei verticale a seringii este neglijabilă.

§ 1364. — Pentru puncţia cardiacă la broască (fixată cu 4 ace pe plută şi neanesteziată) se ridică mai întâi pielea, apoi plastronul pectoral; mâna stângă apucă apoi cu o pensă pericardul de partea vârfului inimii şi trage caudal (în felul acesta inima se fixează); mâna dreaptă, înarmată cu o seringă Luer de 5 cc, încărcată cu 0,5 heparină $1^0/_{00}$, puncţionează ventriculul şi extrage 5 cc sânge.

§ 1365. — Plasma de om se prepară din sângele prelevat prin puncţia uneia din venele plicii cotului. Concentraţia heparinei în sânge trebue să fie cel puţin de 1/10 000. Chiagul plasmatic de mamifere şi de om în special are tendinţa de lichefiere.

§ 1366. — Proliferarea celulelor în plasma heparinată este egală cu cea din plasma neheparinată.

§ 1367 — Plasma heparinată se mai poate prepara şi in vivo, injectând animalului heparină. Cantitatea de heparină injectată se socoteşte după următoarea formulă: greutatea corpului animalului se împarte la 12, cifra rezultată reprezintă cantitatea totală de sânge în cc. Pentru fiecare 5 cc de sânge este nevoie de 1 mg heparină, deci cifra care reprezintă cantitatea totală de sânge a animalului se împarte la 5; cifra rezultată din ultima împărţire se înmulţeşte cu 1 mg; de exemplu:

$$\text{un cobai cântăreşte } \frac{360\ \text{g}}{12} = 30; \quad \frac{30}{5} = 6;\ 6 \times 1 = 6\ \text{mg}.$$

Cantitatea necesară de heparină se injectează intravenos şi după 15' se recoltează sângele în mod obişnuit şi se centrifughează.

§ 1368. — Există şi alte procedee de preparare a plasmei; ele însă sunt mai complicate şi nesigure. Plasma preparată prin astfel de procedee nu corespunde cerinţelor fiziologice, deaceea doar le menţionăm: plasma stabilizată prin peptonă este aceea a cărei coagulabilitate este suspendată pentru un timp; plasma Bordet şi Gengou (toate recipientele sunt parafinate şi ţinute la ghiaţă); plasma citratată (se întrebuinţează de unii autori pentru cultivarea tumorilor); plasma oxalatată; plasma hirudinată; plasma poate fi diluată cu ser sanguin. Tot ca mediu de cultură poate fi întrebuinţată umoarea apoasă a ochiului, lichidul de ascită, lichidul amniotic.

§ 1369. — Soluţiile saline. Pentru prepararea soluţiilor saline se întrebuinţează sărurile păstrate în flacoane originale, bine astupate şi disolvate în apă bidistilată. Cântărirea sărurilor trebue să fie exactă. Sterilizarea soluţiilor se face prin filtrare (filtru Seitz E. K. sau lumânări

Chamberland L_3). Nu se recomandă fierberea sau autoclavarea soluțiilor. Controlul sterilității se face prin însămânțare pe geloză și bulion. pH-ul soluțiilor saline trebue controlat înaintea filtrării. El trebue să fie mai ridicat cu 2—4 zecimi decât cel căutat, pentrucă în timpul filtrării scade. Variază între 6,8—7,8 (după soluție). După filtrare, soluțiile saline trebue să fie clare. La prepararea soluției Tyrode, NaCl trebue adăugat la urmă. După ce soluția salină se filtrează, se distribue cu toate precauțiile de sterilitate în flacoane Erlenmeyer de 50 și 100 cc sau în alte recipiente.

§ 1370. — Se recomandă mai multe feluri de soluții saline; cea mai frecvent întrebuințată este soluția Tyrode.

Formula pentru unele soluții saline:

	Ringer p. sânge cald	Ringer p. sânge rece	Ringer Locke	Ringer Lewis	Tyrode	Drew II
NaCl . . .	9	7	6,5-8,5	7-9	8	9
KCl . . .	0,42	0,25	0,2	0,42	0,2	0,42
CaC_2 . . .	0,25	0,3	0,25	0,25	0,2	0,2
MgCl . . .	—	—	—	—	0,1(0,2)	—
$NaHCO_3$ . .	—	—	0,1(0,2)	0,2	1,0(0,5)	0,2
NaH_2PO_4 . .	—	—	—	—	0,05(0,1)	—
$CaH_4(PO_4)_2$	—	—	—	—	—	0,1
$MgHPO_4$ . .	—	—	—	—	—	0,1
$MgSO_4$ . .	—	—	—	—	—	0,1
Glucoză . .	—	—	ev.1	2,55	ev.1	—
Bulion . . .	—	—	—	200 cc	—	—
pH	—	—	6,7	6,8-7,2	7,6	—

Soluția salină care va fi întrebuințată pentru culturi, în cazul adăugării de antibiotice, nu trebue să conțină glucoză.

§ 1371. — **Trefone sau substanțe excitoformatoare.** Trefonele (Carrel) sunt substanțe proteice nespecifice, care se extrag din leucocite, din măduva oaselor, placentă, mușchi, splină sau țesuturi embrionare. Ele reprezintă partea esențială a mediului de cultură, îndeosebi pentru culturile de durată și pentru culturi de țesuturi adulte.

Materialul necesar pentru prepararea extractului: leucocite, măduva oaselor, splină, mușchi sau ouă de găină incubate de 7—8 zile, sau femele în gestație. Tuburi de centrifugă, flacon Erlenmeyer de 50 cc cu perle, soluție Tyrode, pahare de ouă, cutii Petri, pahar conic cu alcool, în care se țin instrumente; foarfeci (mijlocii și mici), pensă anatomică (mijlocie), mască. Totul steril; se lucrează sub protecția măștii.

§ 1372. — **Extractul leucocitar.** In tuburi înguste se centrifughează 20 minute la 3 000, ture fie sângele normal de animal de care dispunem

sau sângele leucemic, fie lichid peritoneal sau pleural produs prin injectarea în cavitate, de soluție fiziologică. După centrifugare, se decantează lichidul supernatant, apoi, cu prudență, se scoate chiagul alb, care reprezintă leucocitele și se spală în Ringer de mai multe ori. Chiagul este trecut într'un tub de centrifugă, fărâmițat, diluat cu Tyrode în cantitate de patru ori mai mare decât volumul său și după o macerație de 1—2 ore se centrifughează 30 de minute la 3 000 ture. Lichidul supernatant clar se distribue în fiole. Se păstrează la rece și poate fi întrebuințat timp de câteva zile.

§ 1373. — **Extractul embrionar** (de preferat). Se poate prepara din orice embrion de mamifer, însă cel mai economic și tot atât de activ s'a dovedit să fie extractul embrionar de găină. Ouă de găină fecundate se incubează la termostat la 38—39° (în termostat trebue pus un vas descoperit de apă). In fiecare zi, ouăle din termostat se răsucesc în jurul axului longitudinal cu 90—180°. După 8 zile, ouăle se scot din termostat și în aceeași poziție (ca să nu se schimbe poziția embrionului ce se găsește în partea superioară) se pun pe un suport (solniță) sau într'un pahar de ou cu camera de aer în sus. Se umectează bine cu alcool (de trei ori) numai partea de sus și apoi cu o foarfecă (sau cu freza dela o bormașină) se face o fereastră prin care se scoate steril embrionul. Cu o foarfecă se face o tăietură în sacul amniotic; embrionul apare în breșă. Cu pensa ținută în mâna stângă se apucă embrionul de amândouă picioarele și se ridică; în aceeași clipă, mâna dreaptă, cu forfecuța, taie învelișurile embrionului, care-l țin fixat de gălbenuș. Embrionul extras este pus într'o cutie Petri, care conține soluție salină fiziologică sau Tyrode; se debarasează de eventualele resturi de gălbenuș prins în membrane și este deschis pe linia medio-ventrală, pentru ca prisosul de sânge să se scurgă. Se trece într'o a doua cutie Petri, unde se spală din nou bine. Aici eventual se izolează organul (inima, ficatul, creierul, etc.) al cărui țesut dorim să-l cultivăm și îl trecem în altă cutie Petri, pe care o punem în termostat. Embrionul, în mare parte disecat, este trecut într'un flacon Erlenmeyer de 50 cc prevăzut cu perle. Flaconul se agită până când embrionul se transformă în pulpă. Se adaugă apoi Tyrode de trei ori volumul embrionului; totul se lasă să macereze timp de $^1/_2$ oră. Urmează centrifugarea 30 de minute la 3 000 ture. Lichidul supernatant, clar, se distribue în tuburi de precipitare; poate fi întrebuințat imediat sau în decurs de 2—4 zile, ținut la frigorifer. Dacă extractul nu este clar, se centrifughează din nou; el trebue să fie debarasat de orice celule rămase eventual în suspensie. Filtrarea nu se recomandă, deoarece, unele din moleculele proteice fiind mari, pot fi reținute. Deasemenea nu se recomandă întrebuințarea malaxorului metalic. Malaxorul poate fi înlocuit cu o seringă Luer neînarmată cu ac. Cantitatea prea mare de extract embrionar în culturi sporește metabolismul celular, ceeace determină îmbătrânirea precoce a culturilor.

§ 1374. — **Procurarea ţesuturilor pentru cultivare.** Orice ţesut animal sau vegetal poate fi cultivat. Ţesuturile embrionare se cultivă cel mai uşor; cu oarecare perseverenţă pot fi cultivate atât ţesuturile adulte normale, cât şi ţesuturile patologice (tumorale).

§ 1375. — Ţesuturile embrionare dela mamifere se pot recolta prin laparotomie dela femelele gravide (de preferat fără anestezie) şi cu toată rigurozitatea asepsiei (mască). Pentru o mai uşoară orientare în disecarea embrionului, se recomandă întrebuinţarea lupei. Uterul plin se scoate în întregime, se trece într'o cutie Petri cu Tyrode, se deschide. Embrionii sunt scoşi, debarasaţi de placentă şi de învelişurile lor; ei trebue bine spălaţi de sânge (eventual deschişi); se trec apoi în a doua cutie Petri, unde se disecă în vederea izolării organului sau ţesutului preferat, care sunt trecute într'o a treia cutie Petri prevăzută cu Tyrode. Aici, cu o forfecuţă foarte fină şi ascuţită, ţesutul sau organul ales este tăiat (fărâmiţat) în fragmente mici de circa 1,5 mm². Pentru contrast este util ca această cutie Petri să fie aşezată pe o hârtie neagră. Fragmentarea ţesutului este o operaţie delicată.

§ 1376. — Ţesutul trebue să fie cât mai puţin maltratat (strivit, zdrenţuit), marginile fragmentului trebue să fie drepte, curate şi fără suprafeţe acoperite cu seroase. Când am obţinut numărul necesar de fragmente, atunci, în aşteptarea altor preparative (extract embrionar, etc.), cutia acoperită cu fragmentele de ţesut este pusă la 37°. Unii cercetători recomandă păstrarea ţesuturilor la rece. Embrionul din care a fost izolat organul, cât şi placenta lui, poate fi întrebuinţat pentru prepararea extractului embrionar.

Mult mai puţin costisitor şi mai uşor de manevrat este ţesutul embrionar de găină, cu condiţia prevederii unei rezerve de ouă incubate la termenul dorit. Pentru extragerea embrionului de găină din oul incubat, vezi prepararea extractului embrionar. Fragmentarea se face la fel pentru orice ţesut.

§ 1377. — Prelevarea ţesutului adult normal sau patologic se face cu aceeaşi rigurozitate de asepsie. Ţesuturile superficiale eventual infectate (pielea, carnea, tractul digestiv, căile uro-genitale) se sterilizează prin numeroase spălări în Tyrode.

§ 1378. — Pentru studii de hematologie, cultivarea leucocitelor din sângele normal sau patologic se face din chiagul alb ce se adună în tubul (îngust) de centrifugă între stratul de plasmă şi chiagul roşu (eritrocite). După prelevarea plasmei, peste chiagul alb se pun câteva picături de extract embrionar, ceeace determină gelificarea şi consolidarea chiagului. Chiagul extras din tub (cu o ansă sau spatulă) este spălat cu Ringer pentru a fi debarasat de eritrocite; apoi chiagul se trece pe o lamă şi cu un bisturiu de iridectomie este fragmentat printr'o mişcare de tocare.

Limfa şi limfocitele dela mamifere se pot procura uşor din vasul aferent al ganglionului limfatic din regiunea poplitee (la cobai ganglionul limfatic se găseşte în loja adipoasă sub marginea medială a muşchiului biceps femural). Se procedează în modul următor: după ce ganglionul a fost găsit, pe suprafaţa lui posterioară se vede o mică arteră care pulsează; această arteră se leagă; împreună cu ea rămâne legat şi vasul limfatic eferent al ganglionului. Segmentul arterei ce se găseşte dincolo de legătură scade în dimensiune din cauza încetării aportului sanguin, iar vasul limfatic, dimpotrivă, se umflă cu limfa ce nu poate să se scurgă şi devine uşor vizibil. Se punctionează acest vas limfatic umflat cu o pipetă capilară. In 20 de minute se poate culege 1 cc limfă. Limfa se centrifughează; lichidul supernatant reprezintă limfă pură. Chiagul se consolidează cu o picătură de suc embrionar, apoi poate fi întrebuinţat ca material de cultivat. Limfa este un bun mediu de cultură, îndeosebi pentru limfocite.

PUNEREA CULTURILOR (METODA CULTURILOR PE LAMELĂ)

§ 1379. — Soluţia salină, plasma, extract embrionar, ţesutul de cultivat fiind preparate, procedăm la punerea culturilor.

§ 1380. — **Material necesar.** Câmpuri de hârtie de ambalaj (25/40 cm²) sterile (în pachete), câmpuri de hârtie neagră (12/12 cm² în pachete); două pahare conice (pentru alcool şi pentru Tyrode); mai multe cutii Petri; tuburi largi pentru protecţia pipetelor; pipete Pasteur capilare (cu debit egal); cutie Petri cu vată imbibată cu alcool pentru mâini; pensete şi forfecuţe drepte şi curbe; pensă cu cioc lat; pachete de lame scobite sau simple; lamele într'un cristalizor mic, cu amestec alcool-eter; rame pentru lame; creion dermografic; parafină dură într'un pahar Berzelius (circa 150 cc); amestec de ceară-parafină-vaselină într'un pahar Berzelius (150 cc); fiole cu plasmă; flacoane cu Tyrode; fiole cu suc embrionar.

Este important ca toate obiectele enumerate să fie puse pe masa de lucru într'o anumită ordine.

§ 1381. — **Aranjarea mesei de lucru** (fig. 19). In faţa operatorului, pe o masă plană (eventual pe un patrat de geam gros (1), se pune un câmp de hârtie sterilă (2), pe care se aşează obiectele enumerate în două rânduri (posterior şi anterior). Mai întâi posterior stâng, cu două jumătăţi ale unei cutii Petri mari, se acoperă din câmpul steril două zone (3, 4). Posterior drept se găsesc cele două pahare conice (5, 6) cu Tyrode şi cu alcool, în care se pun penseta şi forfecuţa. Intre Petri-uri şi paharele conice se găseşte flaconul cu Tyrode (7) cu dopul deslegat. Anterior stânga, cristalizorul cu lamele în alcool (8) şi pe un câmp negru cutia Petri cu fragmente de ţesut pentru culturi (9). Anterior dreapta se pun la rând patru tuburi protectoare largi (10, 11, 12, 13); în primele trei tuburi se pune câte o pipetă capilară; în al patrulea tub se pune pensa Ehrlich. Tot în dreapta se pune cutia Petri cu vată imbibată în alcool (14).

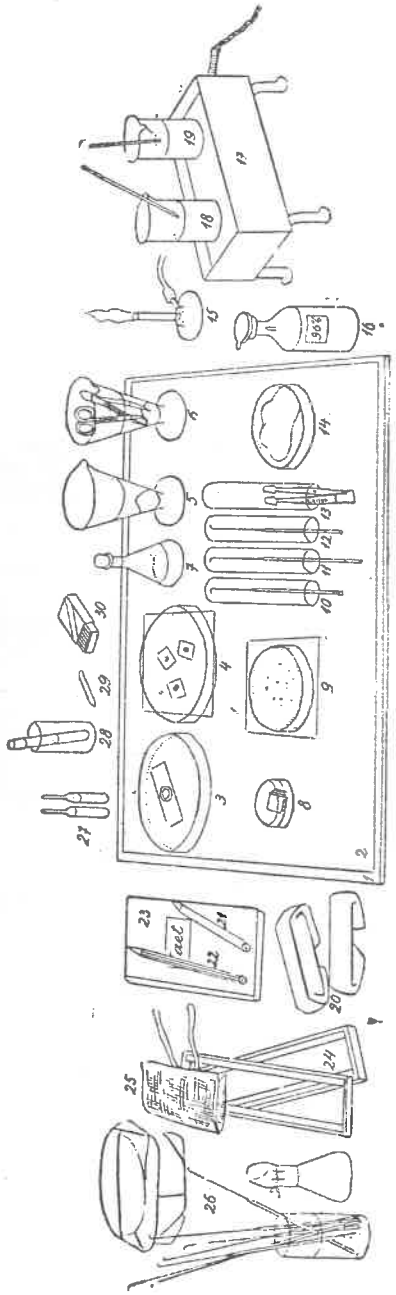


Fig. 10. — Aranjarea mesei de lucru.

1—pătrat de geam gros, 2—câmp steril de hârtie, 3—4 capace Petri, 5—6 pahare conice, 7—flacon cu Tyrode, 8—lamele în alcool, 9—fragmente de țesut, 10—13 tuburi protectoare, 14—vată cu alcool, 15—bec de gaz, 16—flacon cu alcool, 17—baia cu nisip, 18—parafină topită, 19—ceară-parafină-vaselină, 20—lame, 21—creion denuografic, 22—creion, 23—caiet, 24—rame pentru lame, 25—masca, 26 cutii Petri de rezervă, pipete etc, 27—fiole cu plasmă, 28—suc embrionar, 29—pilă, 30—chibrituri.

In afara câmpului de hârtie, la dreapta, se află un bec de gaz (15) sau o lampă cu alcool, flaconul cu alcool (16), baia cu nisip (17), pe care stau cele două pahare Berzelius, unul cu parafină topită (18), altul cu amestec de ceară-parafină-vaselină topită (19); în fiecare Berzelius, câte o pipetă Pasteur cu cioc scurt.

La stânga câmpului de hârtie se așează pachete cu lame scobite sau simple, câte 3—5 lame în pachet (20), creionul dermografic (21), creionul simplu (22), caietul de lucru (23), ramele pentru lame (24), masca (25), rezervele (26) de cutii Petri, Tyrode, alcool, pipete capilare, etc. In spatele câmpului de hârtie se află fiole cu plasmă (27), tub cu suc embrionar (28), o pilă (29), chibrituri (30).

§ 1382. — Punerea culturilor se face în următoarea ordine:

1. Cu pensa Ehrlich se scot din cristalizorul mic (8), rând pe rând, 5—7 lamele, care mai întâi se flambează, apoi se pune una la distanță de cealaltă pe un câmp negru sub capacul cutiei Petri (4).

2. Din pachetele de lame (20) se scot lame pe care se face câte un cerc de parafină (cu scopul de a crea sau de a adânci scobitura lamei). Pentru aceasta, mâna dreaptă scoate din Berzelius (18) pipeta încărcată cu parafină topită și circumscrie, în jurul scobiturii lamei ținute în mâna stângă, un cerc (o bordură) cât mai înalt posibil. Lama cu inelul de parafină solidificat se pune sub capacul cutiei Petri (3). Astfel se prepară câte 3—4 lame.

3. Trei pipete capilare deschise și flambate se introduc în tuburile largi protectoare; după ce s'au răcit, se încarcă prima cu plasmă, a doua cu extract embrionar suficient diluat; a treia pipetă rămâne liberă pentru, ca la nevoie, să se absoarbă cu ea excesul din massa culturii.

4. Mâna dreaptă scoate pipeta cu plasmă (10) fără să atingă pereții tubului protector; mâna stângă ridică capacul cutiei Petri (4) care acoperă lamele; ținând pipeta oblic, încep să cadă picături de plasmă; prima picătură o lăsăm să cadă pe câmp, apoi, abil, se depune pe fiecare lamelă câte o picătură. Pipeta cu restul de plasmă se pune la loc în tubul protector (10).

5. Mâna dreaptă scoate din alcool (pahar conic, (6) penseta, o clătește cu Tyrode (pahar conic, (5) ori o flambează. Mâna stângă ridică capacul cutiei Petri (4) care acoperă lamelele. Cu vârful pensetei se întinde fiecare picătură de plasmă pe lamelă, pe o suprafață cu diametru de 1 cm, într'un strat subțire.

6. Cu aceeași pensetă (după clătire) luăm (fără să strivim) câte un fragment de țesut (9) și-l depunem în mijlocul rotogolului de plasmă de pe lamelă.

7. Fără întârziere, peste fragmentul de țesut bine plantat în picătura întinsă de plasmă se depune câte o picătură de extract embrionar din pipetă (11). Dacă extractul embrionar dela început n'a fost suficient diluat cu Tyrode, atunci culturii i se adaugă o picătură de Tyrode.

Contactul ţesutului şi extractului embrionar cu plasma provoacă coagularea ei. Succesiunea timpului 6 şi 7 trebue să fie rapidă şi abil făcută, altfel structura fibrilară a chiagului plasmatic este deranjată, creşterea uniformă a celulelor este împiedicată şi cultura capătă un aspect turbure.

8. După ce, rând pe rând, au fost puse toate culturile (3—5), ridicăm cu pensa lată o lamelă încărcată cu cultură, o răsucim repede cu faţa în jos şi o depunem peste lama cu inelul de parafină. Dacă se lucrează fără ajutor, atunci se scoate mai întâi o lamă cu inel de parafină de sub capacul cutiei Petri (3) şi se aşează peste acesta; apoi cu mâna dreaptă înarmată cu pensa cu cioc se scoate o lamelă încărcată cu cultură (4); printr'o mişcare de pronaţie a mâinii drepte, lamela se răsuceşte şi ia poziţia cu cultura în jos; mişcarea trebue să fie scurtă şi rapidă, aşa ca picătura semilichidă a culturii să nu aibă timp să se deplaseze spre marginea lamelei. Mâna dreaptă depune lamela exact peste inelul de parafină al lamei ţinută cu mâna stângă. Sub lamelă se formează o cămăruţă destul de adâncă.

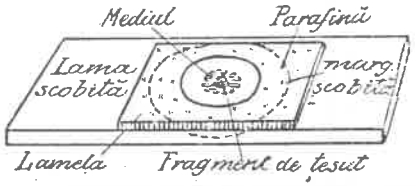


Fig. 20. — Cultura pe lamelă.

9. Urmează sigilarea lamelei. Mâna dreaptă ţine pipeta încărcată cu amestec de ceară topită şi parcurge cu ea cele patru laturi ale lamelei, supraveghind pătrunderea uniformă a amestecului între lamă şi lamelă în jurul inelului. Inchiderea culturii trebue să fie ermetică, altfel cultura se usucă (fig. 20).

10. Cultura fiind închisă capătă un număr curent, care se înscrie pe lamă cu creionul dermografic. Apoi lama se răsuceşte cu lamela în jos şi se aşează pe ramă (cultura în picătură culcată). După ce pe ramă s'au adunat câteva lame (3—5), aceasta se pune la termostat la 37°. In caietul de lucru se trec toate culturile numerotate cu adnotările necesare. Lucrul se continuă până la terminarea punerii tuturor culturilor programate.

§ 1383. — Se lucrează sub mască, rapid, dar fără precipitare, calculând fiecare mişcare umectând adesea mâinile cu alcool, ferind cât mai mult cultura de infecţie prin contact şi prin aer, întrebuinţând numai material steril.

Soluţia salină şi plasma se prepară din timp; extractul embrionar poate fi preparat din ajun sau (mai bine) imediat înainte de a pune culturile.

Totodată, din acelaş embrion din care se prepară extractul se poate izola organul sau ţesutul de cultivat.

§ 1384. — In cazul cu'turilor de scurtă durată, în studii de morfologie, culturile pot fi cultivate în medii semilichide sau lichide. Borrel cultivă într'un flacon special mai multe fragmente de ţesut în amestec de extract embrionar 1—2 cc şi V—X picături de plasmă; se obţine un chiag plasmatic foarte lax, ceeace permite o bună creştere. La fiecare 2—3 zile cultura poate fi împrospătată prin aceea că peste chiagul plasmatic se adaugă câteva picături de Tyrode, care apoi se aspiră abil cu pipeta.

§ 1385. — Lewis recomandă ca mediu lichid soluţia salină la care se adaugă bulion (Ringer-Lewis).

Fragmentul de ţesut este depus într'o picătură de Ringer-Lewis întinsă pe lamelă. Culturile cultivate în astfel de medii simplificate sunt foarte fragile, dar au marele avantaj de a fi uşor de îngrijit. In vederea simplificării tehnicii punerii culturilor, dar mai cu seamă a trecerilor şi a îngrijirii lor, Zbarschi a iniţiat recent o nouă tehnică de cultivare în mediu lichid pe lamele de formvar.

§ 1386. — Mediul lichid compus din ser şi extract embrionar este recomandat de Ligneris pentru cultivarea diferitelor ţesuturi chiar în culturi de lungă durată. Extractul poate fi homolog sau heterolog; cel heterolog dă la început o creştere mai slabă, dar după o perioadă de adaptare a ţesutului (2—3 săptămâni) creşterea culturilor în extractul heterolog se egalează cu cea în extract homolog.

Ingrijirea culturilor şi trecerea lor

§ 1387. — Ingrijirea culturilor constă din spălarea şi trecerea lor pe un nou mediu.

§ 1388. — **Material necesar.** Câmp steril de hârtie, câteva cutii Petri, pipete capilare, tuburi largi de protecţie, bisturiu obişnuit, bisturiu de iridectomie, pensete, lame, lamele, pahare conice, alcool, amestec de ceară, plasmă, extract embrionar, soluţie salină.

§ 1389. — **Spălarea culturilor.** Culturile se scot pe rând din termostat. Cu un tampon îmbibat în alcool se şterg lamela şi toată suprafaţa lamei. Cu un bist riu subţire se scoate prisosul de parafină; apoi se introduce cu prudenţă vârful bisturiului între lamelă şi parafină şi se desface lamela fără a o ridica (pericol de rupere a lamelei). Amestecul de ceară (40% ceară de albine, 40% parafină, 20% vaselină) este la temperatura camerei destul de maleabil şi permite deslipirea lamelei. Cu pensa Ehrlich flambată şi răcită ridicăm lamela deslipită şi o punem cu cultura în sus pe capacul unei cutii Petri sterile scoasă atunci din ambalaj. Este bine ca sub cutie să se pună un câmp negru. Cu o pipetă capilară lăsăm să cadă cu grijă peste cultură una sau două picături de Tyrode, astfel ca lichidul să nu atingă marginea lamelei. După un minut de aşteptare,

se aspiră soluția salină cu o pipetă capilară uscată. Operația de spălare se repetă. După ce cultura este astfel spălată, se poate adăuga culturii o picătură de plasmă și de suc embrionar. Marginile lamelei trebue să rămână uscate. Lamela se repune pe o nouă lamă cu inel de parafină și se închide spațiul cu amestec de ceară-vaselină topită.

§ 1390. — Procedeul lui Maximov de a planta cultura pe o mică lamelă rotundă, care se lipește cu o picătură de apă sterilă de o lamelă pătrată mai mare, ușurează mult spălarea culturilor. După deschiderea culturii, lamela rotundă se apucă cu pensa sterilă și în întregime se cufundă în soluție salină de spălat (lamela este sterilă pe ambele părți). După 1—2 minute, lamela rotundă spălată se repune pe o lamelă pătrată; eventual i se adaugă culturii plasmă, suc embrionar, apoi lamela pătrată se fixează la o nouă lamă cu inel de parafină.

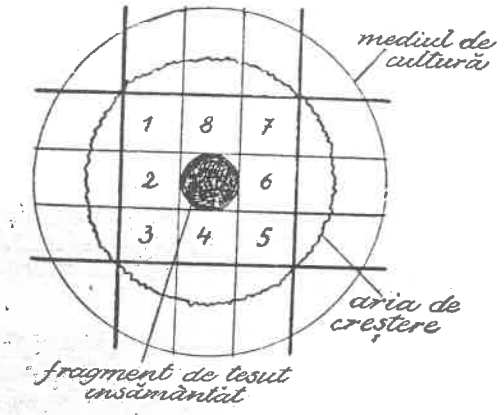


Fig. 21. — Zonele fertile utilizabile pentru trecerea culturilor.

§ 1391. — Atunci când culturile trebue menținute în viață timp mai îndelungat, spălarea culturilor nu este suficientă; trecerea și ajustarea culturilor sunt necesare.

§ 1392. — **Trecerea culturilor** constă în ridicarea părților fertile ale culturii și trecerea lor pe o nouă lamelă într'un mediu nou. Se procedează astfel: lamela desfăcută și spălată este așezată pe capacul unei cutii Petri sau pe alt suport steril, de preferință de culoare închisă. Cu bisturiul de iridectomie sau cu lama de ras bine ascuțită, prin simple mișcări de cădere verticală (nu ferestruire), cultura veche este tăiată (împărțită) în mai multe zone (fig. 21). Centrul opac al culturii reprezintă fragmentul vechi de țesut însămânțat; cercul periferic reprezintă marginea mediului culturii, iar cercul mijlociu (crenelat) reprezintă marginea zonei de creștere. Liniile drepte reprezintă locul de tăiere. Zonele enumerate dela 1 la 8 sunt zone fertile și bune de a fi transplantate. Aceste zone se ridică cu vârful bisturiului (eventual se mai clătesc încăodată în soluția salină) și apoi se implantează pe o nouă lamelă în picătura de plasmă. Mai departe se procedează ca la punerea culturilor. *Atenție*: a) marginile fragmentului transplantat trebue să fie bine întinse pe lamela cea nouă; b) bisturiul cu care se taie cultura nu apasă prea tare lamela (ea poate să se spargă); c) partea din lama bisturiului care a atins marginile lamelei nu va atinge cultura; d) fragmentele tăiate nu se apucă cu penseta (se ridică cu vârful bisturiului). După scopul urmărit, cultura veche poate să fie tăiată în două sau trei părți sau poate să fie excizată numai o singură zonă interesantă prealabil observată la lupă și marcată pe dosul lamelei. Cultura veche mai poate fi ajustată sau debarasată de marginile ei puțin fertile și de prisosul chiagului plasmatic prin patru tăieturi periferice (fig. 4, liniile groase).

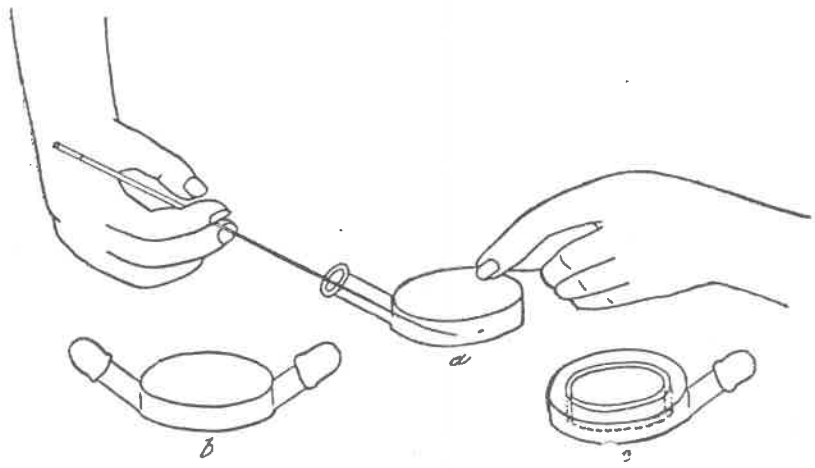


Fig. 22. — Flacoane Carrel.

Deasemenea, fragmentul inițial autolizat poate fi enucleat cu vârful bisturiului. Cultura rămasă se spală, locurile rămase goale în urma extirpării se complectează cu plasmă nouă. In general, transplantările se fac anevoios, deaceea trebue să avem în rezervă numeroase culturi pentru complectarea pierderilor.

Este demonstrat că viața unui țesut in vitro este indefinită, cu condiția unei îngrijite spălări și treceri a culturii. Durata de cultivare variază după scopul urmărit. Culturile care se țin la 37° trebue preschimbate la fiecare 2—3 zile, cele care stau la 15—20° pot fi transplantate la 2—3 săptămâni.

§ 1393. — Pentru culturile mezenchimale de lungă durată se recomandă cultivarea în flacoane Carrel (fig. 22). Există mai multe modele de flacoane Carrel. In principiu, flaconul se prezintă ca o cutie Petri mică, închisă în toate părțile, având una (sau două) tubuluri laterale; unele modele au fundul demontabil (model *c*).

Pentru punerea culturilor în flacoanele Carrel este nevoie de următoarele: pipete gradate de 1—5 cc; flacoane Carrel tip *a* sau *c*; spatulă

sau ansă de platină; bisturiu de iridectomie; pipete Pasteur, pipetă cu bilă.

§ 1394. — Punerea culturilor: prin tubulura laterală cu pipeta gradată se introduc în flacon (model *a*) 2 cc plasmă, 1 cc lichid Tyrode şi 1 cc extract embrionar. Totul se amestecă şi, fără a pierde timp, se introduce cu o spatulă fragmentul (sau fragmentele) de ţesut care se depune în plasma încă necoagulată. După 1—2 minute amestecul plasmă + Tyrode + extract embrionar coagulează (faza solidă) şi prinde în reţeaua de fibrină fragmentele de ţesut însămânţate. Peste faza solidă se introduce în flacon un amestec de 1,5 cc lichid Tyrode şi 1,5 cc extract embrionar (faza lichidă). Flaconul se astupă şi se pune la termostat. La fiecare 2—3 zile flaconul se deschide; faza lichidă se aspiră cu pipeta cu bulă; cultura se spală 5—10 minute cu 2—3 cc lichid Tyrode care se introduce şi se aspiră cu o pipetă. Se pune din nou fază lichidă şi culturile continuă să stea la termostat. După 10—12—15 zile de cultivare, în care timp culturile au fost spălate regulat şi mediul lichid a fost reînnoit, urmează transplantarea culturii, adică trecerea pe un nou mediu solid (faza solidă). Pentru aceasta, cu o spatulă se scoate (se taie) din chiagul plasmatic un pătrăţel în care este cuprins fragmentul de ţesut şi se pune pe o lamă. Cu bisturiul de iridectomie se taie prisosul de chiag plasmatic şi chiar marginile culturii. Fragmentul iniţial de ţesut şi cu o bună parte din zona de creştere se plantează într'un flacon Carrel în felul arătat mai sus. Atunci când trebue făcute mai multe treceri se recomandă întrebuinţarea flacoanelor model *c*, prevăzute cu fund demontabil.

EXAMINAREA CULTURILOR

§ 1395. — Culturile de ţesuturi pot fi studiate: I. pe preparate proaspete; II. pe preparate colorate vital; III. pe preparate fixate.

§ 1396. — Pe preparate proaspete se pot urmări:

a) Felul de creştere din punct de vedere cantitativ, măsurând zona de creştere cu ocularul cu micrometru sau calculând indicele de creştere cu ajutorul planimetrului (suprafaţa zonei de creştere exprimată în cm^2 se raportează la suprafaţa fragmentului însămânţat).

b) Puterea de migrare a elementelor mobile (macrofage, microfage, monocite).

c) Contractilitatea mioblaştilor.

d) Structura celulelor: nucleul, nucleolii, citoplasma cu mitocondrii şi diverse granule (examen la imersie).

e) Diviziunea celulară (amitoza şi mitoza).

f) Moartea celulară: picnoza nucleului, omogenizarea protoplasmei (dispariţia mitocondriilor şi granulelor), apariţia vacuolelor. Moartea culturilor poate fi urmărită fie pe culturile îmbătrânite, ceeace durează

mult timp (24—72 de ore), fie pe culturi tinere cărora li se introduce un toxic (de exemplu $KMnO_4$ 1/40 000) când moartea survine rapid 1/2 — 1 oră.

§ 1397. — Examenul direct al culturilor se face fie la lupă, fie la microscop, pe platina căruia, dacă este posibil, se adaptează o platină încălzitoare sau se întrebuinţează o cutie încălzitoare (pentru a evita formarea picăturilor de apă de condensare care jenează examenul şi mai cu seamă fotografierea).

Cultura poate fi examinată fie aşa cum este montată pe lama scobită, fie special montată pe o lamă simplă (fără scobitură). Pentru cazul din urmă, lamela încărcată cu cultura de examinat se ridică steril cu pensa Ehrlich şi foarte abil se aplică pe o lamă simplă. La nevoie, sub lamelă poate fi introdusă, cu ajutorul pipetei capilare, o substanţă cu acţiune farmacodinamică sau un colorant vital. Lamela poate fi sigilată cu vaselină. După ce au fost examinate, culturile vii pot fi fixate şi colorate după nevoie. Cinematografierea în studiul culturilor vii dă învăţăminte practice importante.

§ 1398. — Coloraţia vitală aplicată ţesuturilor cultivate in vitro se întrebuinţează pentru: studiul organitelor celulare, studiul fagocitozei, determinarea colorimetrică a pH-ului intracelular şi altele.

Coloraţiile vitale, din cauza difuziunii mai rapide a colorantului, reuşesc mai uşor pe culturi cultivate în mediu lichid; şi mediul solid permite totuşi coloraţia vitală.

Coloraţia vitală nu este o coloraţie propriu zisă, ci o acumulare de colorant în anumite locuri ale celulei.

§ 1399. — Se întrebuinţează coloranţi vitali bazici (roşu neutru, verde Ianus, negru Ianus, albastru de Nil) care pun în evidenţă organite celulare preformate şi mai rar coloranţi vitali acizi (albastru tripan, carmin litinat, albastru pirol), care pun în evidenţă produsele metabolismului celular. Coloranţii vitali se întrebuinţează în diluţii foarte mari (1/10 000 — 1/80 000), preparaţi în soluţii saline încălzite la 30—40° (Ringer). In astfel de diluţii, coloranţii nu sunt toxici, totuşi examenul culturilor colorate cu coloranţi vitali nu poate fi prelungit sau amânat, pentru un timp mai îndelungat. Roşul neutru în diluţie de 1/40 000 colorează pe viu, în roşu, granulaţiile citoplasmatice. Verdele sau negrul Ianus în diluţie de 1/8 000 colorează mitocondriile în verde-închis sau negru; condriomul nu se colorează decât după o aeraţie a preparatului 1/2 oră. Albastrul tripan se întrebuinţează în diluţie de 1/20 000; carminul litinat în diluţii de 1/15 000, albastrul pirol în diluţie de 1/20 000. Coloraţiile vitale reuşesc numai dacă colorantul nu este alterat.

§ 1400. — Coloraţia vitală poate fi executată în mai multe feluri: a) colorantul poate fi adăugat mediului în timpul punerii culturii (deci înainte de orice manifestare de creştere). Dacă mediul este solid, atunci colorantul se adaugă înainte ca plasma să fie coagulată. Colorantul poate fi aplicat după ce cultura a crescut. In acest caz colorantul se

introduce sub lamelă, umplând toată cămăruța culturii (toată scobitura lamei), având grijă să nu rămână bula de aer tocmai la nivelul culturii. Sau cultura se deschide, lamela se ridică şi se pune pe un suport cu cultura în sus; peste cultură se pune o picătură de colorant, apoi după câteva minute lamela se aşează peste o lamă simplă şi se examinează la imersie.

§ 1401. — Pe aceeaşi cultură se pot aplica doi coloranţi vitali; de exemplu, pe o cultură deschisă se pune mai întâi o picătură de roşu neutru; după câteva minute colorantul se absoarbe cu o pipetă capilară uscată; apoi pe aceeaşi cultură se pune o picătură de verde Ianus. Dacă colorația este insuficientă, atunci cu o picătură capilară mai putem adăuga colorant care pătrunde sub lamelă.

Culturile pot fi trecute succesiv în medii care conțin colorant vital.

§ 1402. — Unii cercetători, pentru a evita o eventuală intoxicare a culturilor, în loc de aplicare directă a colorantului vital pe cultură, întrebuințează plasma animalului prealabil injectat intravenos cu acel colorant; sau întrebuințează țesuturile animalului injectat cu colorant vital.

§ 1403. — Studiul fagocitozei se practică pe culturi de splină sau pe culturi de celule tumorale, sau, la nevoie, pe orice țesut mezenchimatos. Obiectul de fagocitat poate fi tuş, spori de licopodiu, carmin, bacteriile sau alt corp inert. Aceste elemente pot fi incorporate mediului în timpul punerii culturii sau după ce cultura a crescut.

§ 1404. — Studiul preparatelor colorate după fixare este indispensabil. Se recomandă următorii fixatori: formol comercial 10% în lichid Ringer amestecurile Bouin, Champy, Carnoy, Zenker, Ceasovnicov, (vezi la fixatori).

Se mai întrebuințează fixatorul Zenker modificat, în care în loc de acid acetic se adaugă puțin acid osmic (la întrebuințare).

§ 1405. — Fixatorii care conțin sublimat sau alcool se vor întrebuința numai la nevoie (glicogen, fibre elastice), căci prin coagulare turbură şi chiar opacifică chiagul plasmatic. Durata fixării variază între 1—12 ore (după fixator). Pentru formol este suficient 1—2 ore. Manipularea culturilor trebue făcută cu multă grijă, având în vedere fragilitatea obiectului. Fiecare cultură (lamelă) trebue tratată individual, sau trebue să poarte un număr scris cu tuş pe dos şi acoperit cu un strat subțire de celoidină; în acest caz, mai multe lamele pot fi fixate dintrodată într'o cutie Petri, plutind pe suprafața fixatorului cu fața în jos.

§ 1406. — Inainte de fixare se recomandă spălarea culturii în soluție salină încălzită la 37°. Deasemenea se recomandă, îndeosebi pentru culturile crescute în mediu lichid, fixarea mai întâi în vapori de formol, sau acid osmic, sau iod, apoi în fixatorul lichid preferat. Se procedează astfel: lamela pe care stă cultura se pune pentru 3—5

minute cu fața în jos pe gâtul unui flacon Erlenmeyer care conține 50 cc formol încălzit sau soluție de acid osmic. Pentru fixarea cu iod se pune într'un godeu un cristal de iod peste care se pune lamela cu fața în jos. Apoi lamela se trece în fixator lichid pentru 1—2 ore. După fixare urmează spălarea în apă de robinet 3—6 ore şi în apă distilată 1 oră; apoi urmează colorarea preferată. Colorarea se face fie pe lamelă

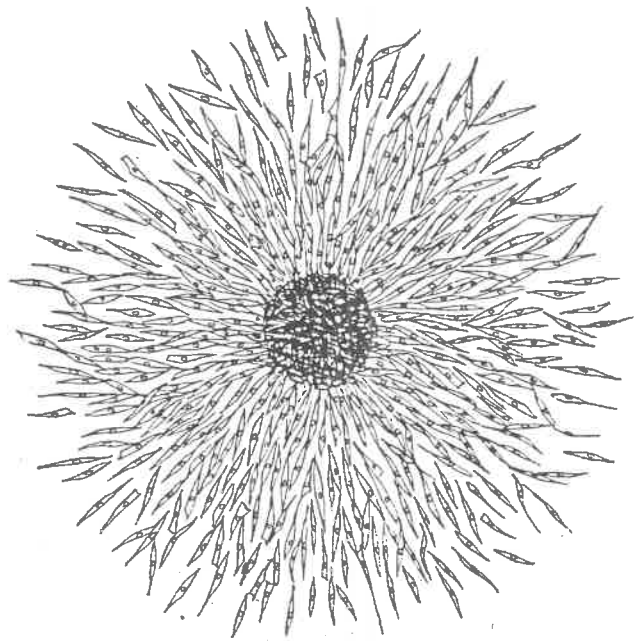


Fig. 23. — Culturi de miocard embrionar. Cultivare şi colorare cu hematoxilină pe lamelă.

(cultura în întregime), fie pe secțiuni, atunci când fragmentul inițial este voluminos sau când cultura a fost cultivată timp mai îndelungat în flacon Carrel.

§ 1407. — Colorarea culturilor în întregime (colorarea pe lamelă) (fig. 23). Timpii indicați pentru fixare, colorare, spălare sunt relativi, deoarece fiecare țesut are particularitățile lui.

§ 1408. — Colorarea cu hemalaun acid. 1. Fixare în formol 2%; 2) spălare în apă de robinet 3 ore; 3) spălare în apă distilată 1 oră; 4) colorare în hemalaun acid 50—60 de picături în 50 cc apă (10—12 ore) sau mai mult. Colorantul se pune într'o sticlă de ceasornic ori într'un Petri deasupra căruia plutesc lamelele cu cultura în jos; 5) spălare în apă 1/2 oră; 6) deshidratare în trei băi de alcool (50%,

75%, 95%) câte 5 minute; amestec acetonă 95%, xilen 5%, zece minute; amestec de acetonă 70%, xilen 30%, zece minute; amestec de acetonă 30%, xilen 70% zece minute; 7) clarificare în xilen I, apoi în xilen II, câte 15 minute; 8) montarea lamelei pe o lamă bine curățată prin aplicarea unei picături de balsam de Canada peste cultură.

Cum puterea tinctorială a hemalaunului variază după felul de preparare, atât concentrația colorantului, cât și timpii diferitelor băi variază.

§ 1409. — Un alt procedeu de colorare cu hematoxilină este următorul: 1) fixare în formol 10%; 2) spălare în apă de robinet 4—5 ore; 3) spălare în apă distilată 1 oră; 4) colorare în hemalaun concentrat (sau diluat 1:2) 2 ore; 5) spălare în apă 3—5 minute; 6) carbonat de litiu soluție saturată 10—15 minute; 7) spălare în apă 1—2 minute; 8) deshidratare în alcool 70°, 96°. absolut, câte 5 minute; 9) clarificare în xilen I, II, III; 10) montare în balsam.

§ 1410. — **Colorarea cu Sudan** pentru grăsimi: 1) fixare în formol 10%; 2) spălare în apă de robinet 3—4 ore; 3) spălare în apă distilată 1 oră; 4) spălare în alcool 50% 1—2 minute; 5) colorare în Sudan, soluție saturată în alcool 70° 20 de minute; 6) clătire în alcool 50°; 7) spălare în apă 5 minute; 8) colorare cu hemalaun (ca mai sus); 9) spălare în apă, 3—5 minute; 10) montare în gelatină.

§ 1411. — **Colorarea cu hematoxilină Heidenhain**: 1) fixare în formol (1 parte formol + 9 părți sol. Ringer); 2) spălare în apă de robinet 5—6 ore; 3) spălare în apă distilată 1 oră; 4) deshidratare în alcool 70%; 5) mordansare timp de 6 ore în 2,5 g alaun de fier disolvat în 100 cc apă distilată; 6) spălare 2—3 ore în apă distilată; 7) colorare în hematoxilină Weigert 24 de ore (1 cc hematoxilină Weigert pentru 1 cc apă distilată); 8) clătire cu apă distilată; 9) diferențiere în alaun de fier sub controlul microscopic până apare bine structura nucleului; 10) spălare în apă distilată 10—15'; 11) deshidratare în alcooluri crescânde; 12) xilen; 13) balsam.

Se colorează numai nucleii, citoplasma rămâne cenușie-palidă; ea poate fi colorată cu verde lumină sau cu eozină adăugată la baia de alcool de 90%.

§ 1412. — **Colorarea cu albastru de metilen**: 1) fixare în formol — Ringer 2%; 2) spălare în apă de fântână 3 ore; 3) spălare în apă distilată 5 minute; 4) colorare cu albastru de metilen Löffler (soluție albastru de metilen alcoolică saturată 30 cc, KOH 1/10 000 100 cc). Colorantul se maturează la 37° timp de o lună.

Lamela cu cultura în sus stă pe un suport. Cu pipeta Pasteur se pun peste cultură câteva picături de colorant. Lamela se încălzește până apar vaporii, flacăra se dă la o parte, iar colorantul continuă să rămână pe lamelă până când se răcește (15 minute); apoi colorantul se varsă de pe lamelă; 5) se spală cu apă (pipeta Pasteur); 6) deshidratare în alcooluri crescânde câte 1 minut; 7) spălare cu amestec acetonă

— xilen 5%, 30%, 70% xilen câte 2 minute în fiecare amestec; dacă însă chiagul plasmatic este gros și încă colorat, atunci durata fiecărei băi se prelungește; 8) xilen I; xilen II câte 2—3 minute; 9) balsam.

Acest procedeu de colorare dă foarte frumoase rezultate prin decolorarea chiagului plasmatic cu amestecul acetonă-xilen.

§ 1413. — Coloratia după Mallory: 1) fixare în formol 10% 3 ore; 2) spălare în apă 5 ore; 3) colorare în fuxină acidă 1%; 4) clătire în apă distilată; 5) baie în soluție apoasă 1% de acid fosfomolibdic 1—2 minute; 6) clătire în apă distilată; 7) colorare timp de 5—20 de minute în albastru de anilină 0,5 g, oranj G 2 g, acid oxalic 2 g, apă distilată 100 cc; 8) clătire în apă; 9) deshidratare în alcool; 10) clarificare în xilen I, II și montare.

§ 1414. — **Coloratia Giemsa** modificată pentru culturi de țesuturi (splină, sânge, măduva oaselor): 1) spălare pe loc a culturii cu soluția salină, absorbind cu pipeta uscată tot ce se poate; 2) fixare în amestecul Maximov (½ oră); 3) spălare în apă distilată; 4) deshidratare în alcool 70°; 5) colorare în Giemsa 24 de ore: ½ sau 1 picătură Giemsa pentru 1 cc apă distilată; 6) spălare în apă distilată; 7) diferențiere în alcool 80—90°, până când apare nuanța roșietică (control sub microscop); 8) alcool absolut; 9) xilen; 10) montare în ulei de cedru sau balsam neutru.

§ 1415. — **Colorarea cu azur II eozină (Maximov) (pentru culturi de splină)**: 1) fixare 20 de minute în amestecul Maximov; 2) spălare cu apă distilată de mai multe ori; 3) baie în alcool 70° unde cultura rămâne până când fixatorul este complect eliminat; 4) colorare cu azur eozină 24 de ore [2 cc eozină (eozină 0,1%) 2 cc Azur II (Azur II 0,1%) la 10 cc apă distilată, se adaugă picurând și agitând]. Inainte de colorare trebue încercat colorantul; 5) diferențiere în alcool de 96° sub controlul microscopului (structura nucleară trebue să se vadă clar); 6) alcool absolut; 7) xilen; 8) balsam.

§ 1416. — **Coloratia Ziehl pentru punerea în evidență a bacililor acidorezistenți din culturi**: 1) fixarea culturilor în formol 12% 2 ore; 2) spălare în apă 4 ore; 3) spălare în apă distilată 1 oră; 4) colorare cu fuxină fenolată 1 oră; 5) decolorare cu acid sulfuric 15% timp de 20—30'; 6) spălare cu apă de robinet 1—2 minute; 7) spălare cu apă distilată 1 minut; 8) colorare cu hemalaun acid (1½ picătură la 1 cc) 12 ore; 9) spălare cu apă de robinet; 10) deshidratare în seria alcoolurilor; 11) clarificare în xilen + acetonă; 12) monatare în balsam.

§ 1417. — **Reacția Feulgen pentru punerea în evidență a cromatinei nucleare.** *a)* Prepararea reacțiilor (vezi § 847).

Tehnica reacției: 1) fixare în formol 1 parte la 4 p. Ringer 2 ore; 2) spălare în apă de robinet 3 ore; 3) spălare în apă distilată 1 oră; 4) hidroliza în soluție normală de HCl (baie în soluție nClH la rece 1 minut. Baie în soluție nClH la 60° 4 minute, baie în soluție nClH la rece 1 minut); 5) clătire în apă distilată; 6) colorare în leucofuxină 90

de minute; 7) trei băi succesive în apă sulfuroasă câte 2 minute; 8) spălare în apă distilată; 9) colorare cu verde lumină 30—60", uscare cu hârtie de filtru; 10) deshidratare rapidă în alcool 80°, 96°, alcool absolut; 11) clarificare în xilen; 12) montare în balsam.

Cromatina se colorează în roşu-violet, citoplasma în verde.

§ 1418. — **Impregnarea cu clorura de aur**: 1) fixare în acid formic 50%, 5 minute. Acidul formic disolvă chiagul plasmatic; 2) culturile se trec direct în clorură de aur 1% pentru 5 minute; 3) spălare în apă distilată; 4) reducerea clorurii de aur 24 de ore în: 1 p. acid formic, 9 p. apă distilată. Aceşti patru timpi se execută la întuneric; 5) spălare; 6) deshidratare, clarificare, montare.

Reuşesc foarte bine numai culturile ale căror celule cresc direct şi aproape de lamelă; culturile care cresc pe suprafaţa chiagului plasmatic nu reuşesc. In acest procedeu de impregnare, membrana celulară cu cele mai fine prelungiri şi legături intercelulare apare net. Celulele cât şi granulaţiile lor capătă nuanţa roşiatică; vacuolele şi nucleii rămân clari, necoloraţi.

§ 1419. — *a)* Includerea în parafină. Culturile menţinute in vitro timp mai îndelungat (de obicei în flacoane Carrel) pot fi studiate şi pe secţiuni. Poate fi secţionată fie cultura în întregime, fie numai fragmentul de ţesut însămânţat. Pentru amândouă cazurile, fixarea se face pe lamelă, şi anume: după ce lamela a fost ridicată cu multă băgare de seamă cu un bisturiu de pe lamă, se curăţă de prisosul de parafină. Apoi cu o pipetă capilară se absoarbe tot ce s'a lichefiat din cultură. Urmează spălarea culturii cu soluţia salină. Fixatorul, ales după ţesut şi după scopul urmărit, se depune cu o pipetă peste cultura întoarsă cu faţa în sus sau, mai bine, lamela cu cultura întoarsă în jos pluteşte pe fixatorul vărsat într'un cristalizor sau într'o sticlă de ceasornic timp de 1—2 ore. Urmează spălarea 2—3 ore, apoi deshidratarea în alcoolurile crescând 70—96° câte o oră în fiecare. După ce a fost fixată sau chiar după ce a fost deshidratată, cultura se ridică de pe lamelă fie în întregime, fie numai fragmentul de ţesut însămânţat. Dacă cultura a crescut bine şi are o bogată zonă de creştere, ea se rade de pe lamelă în întregime cu un bisturiu sau cu o lamă de ras; ea arată ca un disc centrat de fragmentul însămânţat. Dacă cultura are o creştere slabă sau dacă nu ne interesează procesele care s'au petrecut în ţesutul însămânţat, atunci din cultură, cu vârful unei lanţete sau cu un ac (nu cu pensa), se extirpă numai fragmentul însămânţat; fiind prea mic se recomandă să fie colorat cu eozină alcoolică. Mai departe, atât discul (cultura în întregime), cât şi fragmentul de ţesut se prelucrează la fel; se deshidratează în alcool absolut ½ oră sau în alcool-cloroform (peste noapte poate fi păstrat în amestecul cloroform-parafină). Urmează două băi în parafină moale (42°) câte 2 ore, apoi includerea în parafină dură (52°) potrivit încălzită; altfel, ţesutul fiind fragil, se arde. Atât discul, cât şi fragmentul se orientează în modul

dorit, fiind cufundat în parafină turnată într'o sticlă de ceasornic umedă.

§ 1420. — Pentru obţinerea unui bun bloc, vasul cu parafină se pune la răcitor, în apă rece ori pe un bloc de ghiaţă. Secţionarea blocului la microtom, prelucrarea secţiunilor, colorarea se fac după metodele cunoscute. Maximov recomandă fixarea în Zenker-formol şi colorarea cu azur-eozină.

§ 1421. — Dacă este nevoie de un rezultat rapid şi provizoriu, putem recurge la metoda congelării. Fragmentul însămânţat se fixează în formol, se colorează în eozină, se inclavează într'o bucăţică de ficat (fixat şi el) şi totul (ficat împănat cu fragmentul culturii) se congelează şi se taie ca orice ţesut.

§ 1422 — *b)* Includerea în gelatină se recomandă atunci când urmărim grăsimile şi lipoizii din ţesutul cultivat. Fragmentele de ţesut cultivate se fixează mai întâi în vaporii de formol, apoi se extirpă din cultură şi în continuare se fixează într'un fixator lichid. Urmează spălarea în apă (6—10 ore); apoi baia de gelatină subţire la 37° timp de 24 de ore şi baia de gelatină groasă la 37°, timp de 24 de ore. După cele două băi de gelatină, fragmentul de ţesut se trece în gelatina groasă turnată într'un mic vas pentru includere care se pune la răcitor pentru $^1/_2$ oră. Blocul ajustat rămâne în aer până când ia consistenţa unei gume, apoi se păstrează în formol 1:10 timp de 24 de ore. Inainte de a fi secţionat, blocul se spală bine (1—2 ore).

§ 1423. — Gelatina groasă se prepară din 1 parte de pulbere sau bucăţele de gelatină uscată disolvate în 3 părţi de apă fenolată 1% la 37°. Gelatina subţire se prepară din 1 parte de gelatină groasă disolvată în 1 parte de apă fenolată 1%. Soluţiile de gelatină pentru băi trebue ţinute în flacoane ce se astupă bine.

CÂTEVA PROCEDEE SPECIALE DE CULTIVARE A ŢESUTURILOR

§ 1424. — I. Wirth şi G. Barski au imaginat *o tehnică de cultură a ţesuturilor în mediu lichid* care permite o bogată proliferare celulară. Această metodă nu necesită trecerea culturilor, permite cele mai variate colorаţii, observarea la imersie şi la microscopul electronic. Atât ţesutul epitelial, cât şi cel mezenchimatos poate fi cultivat prin această metodă.

§ 1425. — Materialul necesar: pătrate de sticlă (groasă) de 13/13 cm; lame (port-obiect) mici de 2—50 cm/2 cm, cutii Petri, membrane plastice, inele mici de sticlă, vaselină (se lucrează steril).

§ 1426. — Membranele plastice se prepară din « formvar » (polivinil 0,6 la 100 clorură de etilen). Dela o înălţime de 6 cm se picură cu o pipetă Pasteur câte o picătură de soluţie formvar într'un recipient aproape plin cu soluţie Ringer. Pe suprafaţa soluţiei Ringer se formează instan-

taneu o foarte fină membrană plastică cu circa 5 cm diametru. Membranele plastice se culeg de pe suprafața lichidului cu lama mică ținută cu pensa.

§ 1427. — Inelele pătrate de sticlă se confecționează din bagheta de sticlă subțire de 3 mm; interiorul inelului are dimensiuni 10/12 mm.

§ 1428. — **Prepararea mediului**: într'un tub de centrifugă prevăzut cu bile de sticlă se amestecă părți egale de plasmă și extract embrionar. Coagulul care rezultă din acest amestec este fărâmițat prin agitare; totul este centrifugat 10 minute la 5 000 ture. Lichidul supernatant este decantat și adăugat cu 1 parte extract și 2 părți Tyrode. (La acest amestec se poate adăuga penicilină (100 u. pe cc). Mediul poate fi conservat până la 4 zile la +2° până la +4°. Se adaugă la soluția Tyrode 50 mg % roșu fenol, ceeace permite supravegherea pH-ului în timpul culturii.

§ 1429. — Prepararea cămărușelor de cultivare: cu o pensulă muiată în vaselină fierbinte se trag pe suprafața pătratului de sticlă (13/13) patru benzi verticale și trei benzi orizontale, așa fel ca între ele să rămână libere 6 cămărușe (6 ochiuri libere). Peste aceste ochiuri libere de vaselină se pun lame mici prevăzute cu membrane plastice.

§ 1430. — **Punerea culturilor**: lama mică (2,5/2 cm port-obiect), ținută cu o pensă, se introduce sub membrana plastică ce plutește pe suprafața lichidului Ringer; membrana plastică este pescuită pe lama mică și aderă de ea (eventual marginile membranei se îndoaie sub lamă). Lamele astfel garnisite se pun peste ochiurile rămase libere între benzile de vaselină; ele sunt ușor apăsate, astfel ca marginile lor să se înfunde în vaselină. Peste fiecare lamă se pune câte un inel. In lumenul inelului, cu o pipetă Pasteur, se pune lichidul nutritiv, picătură cu picătură. Lichidul formează o suprafață cu menisc concav. In lichidul nutritiv se pun unul sau câteva fragmente de țesut pentru cultivare. Este important ca fragmentele să adere de membrana plastică, să fie orientate la oarecare distanță între ele și dela peretele inelului în timpul manipulării să nu fie maltratate. Toate căsuțele fiind însămânțate, pătratul mare de sticlă (13/13) este acoperit cu un capac Petri ce se fixează de sticla cu parafină. Parte din lichidul nutritiv se scurge pe sub inel, totuși prin capilaritate rămâne o cantitate suficientă de lichid pentru nutriția fragmentului (fig. 24).

§ 1431. — Observarea culturilor se poate face la obiectivul mic, direct prin Petri sau pentru observarea la obiectivul mijlociu se procedează în felul următor: pătratul de sticlă cu capac Petri se scoate din termostat și se lasă să se răcească 15 minute la temperatura camerei. In acest timp se pune la termostat să se încălzească un alt pătrat de sticlă ambalat în hârtie (steril). După ce culturile s'au răcit, capacul Petri se ridică și se înlocuește cu pătratul de sticlă ce se încă zea la termostat. Acest pătrat de sticlă se aplică direct peste inele, ceeace permite examenul la microscop cu un grosisment mijlociu (condensarea umidității este evitată).

§ 1432. — **Ingrijirea culturilor.** După trei zile de cultivare se face o spălare nutritivă. Pentru aceasta se deslipește capacul și cu o pipetă cu bulă se asigură mediul nutritiv vechi. Cu o altă pipetă i se adaugă fiecărei culturi un nou mediu nutritiv. Se aplică cu un nou capac, se lipește cu parafină și culturile se pun mai departe la incubație, unde se țin timpul dorit.

§ 1433. — **Fixarea și colorarea**: se deslipesc capacele așezate peste culturi, se aspiră lichidul nutritiv, inelele se ridică ușor. Pătratul de sticlă mare cu cele 6 culturi se răstoarnă cu fața în jos și se pune într'un cristalizor care conține fixator (acid osmic 1%). După 2 minute, pătratul de sticlă se ridică (culturile trebue să fie cafenii-palid) și se spală bine cu apă bidistilată pentru a îndepărta mediul nutritiv. Preparatele sunt puse vertical pentru uscare, apoi sunt tratate ca orice frotiu. Coloratia Giemsa dă rezultate foarte bune. Pot fi folosiți și alți fixatori și alte colorații.

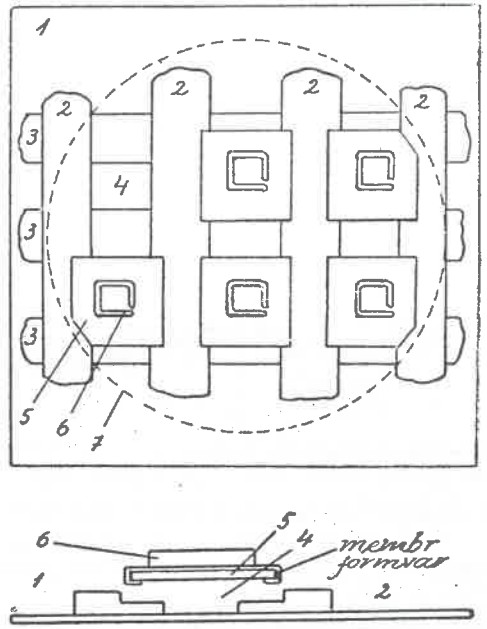


Fig. 24. — Punerea culturilor după Barski. 1 — patratul de sticlă (13 × 13 cm); 2 — 3 — benzile de vaselină; 4 — ochiuri libere; 5 — lama port-obiect; 6 — inel de sticlă; 7 — locul capacului care acoperă toate culturile.

§ 1434. — Pentru obținerea culturilor epiteliale pure, Fischer cultivă mici fragmente de iris *pe suprafața chiagului plasmatic*. Pentru aceasta se depun pe o lamelă cantități egale de plasmă (1 picătură) și suc embrionar de găină. Când chiagul plasmatic începe să se formeze, pe suprafața lui se depune fragmentul de iris (sau alt țesut epitelial). Este important ca fragmentul de țesut să fie depus în momentul oportun, adică nu prea devreme (înainte de a începe coagularea), căci atunci fragmentul se înfundă în grosimea mediului, nici prea târziu (după ce s'a produs coagularea totală), când fragmentul nu poate să se ancoreze pe suprafața chiagului. După ce fragmentul a fost depus și a prins contact cu chiagul plasmatic, culturii i se mai adaugă o picătură de suc embrionar care umectează bine fragmentul de țesut pe suprafața

chiagului. In acest strat subțire de extract embrionar vor crește noile celule epiteliale.

Pentru preschimbarea mediului și trecerea culturii, mediul lichid și cel lichefiat (fenomen adesea observat în culturile epiteliale) poate fi absorbit cu hârtie de filtru (sterilă).

Apariția în culturi a noilor celule epiteliale poate să întârzie 3—8 zile.

Particularitățile tehnicii culturii țesuturilor tumorale (Timofeevschi și Benevolenscaia).

§ 1435. — *Alegerea țesutului.* Se pot cultiva: *a)* țesuturi tumorale fără zone de necroză; *b)* țesuturi cât mai sărace în stromă; *c)* țesuturi tumorale ale căror celule au caracter cât mai atipic.

§ 1436. — *Elementele mediului* de cultură al celulelor tumorale sunt aceleași ca și pentru țesuturile normale, totuși, din cauza tendinței mediului la lichefiere se recomandă micșorarea cantității sucului embrionar și întrebuințarea heteroplasmei (de obicei plasmă de găină). Când lichefierea mediului începe să apară, atunci, cu o pipetă capilară uscată, se absoarbe tot ce s'a lichefiat și se pune în loc plasma proaspătă.

§ 1437. — Procedeele de cultivare cele mai uzuale sunt următoarele:

Pentru țesuturile tumorale care cresc repede se practică metoda de cultivare în picătură suspendată. Mici fragmente de țesut tumoral (1—3 mm) se plasează în mediul compus din homo- sau heteroplasmă și extract embrionar (faza solidă) întins într'un strat uniform și subțire pe o lamelă. Lamela încărcată cu cultură se aplică cu fața în jos deasupra unei lame scobite și apoi se lipește ermetic din toate părțile, cu parafină. Trecerile se fac la 2—6 zile, fie transplantând cultura în întregime pe un nou mediu, fie tăind cultura în două sau în mai multe părți (multiplicând culturile). Inainte de a face trecerea, cultura se debarasează cu un bisturiu ascuțit de prisosul de chiag plasmatic (se ajustează) și se spală bine în soluție salină.

§ 1438. — Pentru țesuturile tumorale care cresc încet in vitro se practică metoda de cultivare în flacoane Carrel. După ce în flacon a fost introdusă faza solidă a mediului, compusă din 10—12 picături Tyrode, 8—10 picături plasmă heparinată de găină și 2—4 picături extract embrionar de vacă, cu un bisturiu sau cu o spatulă se plasează peste faza solidă a mediului, la distanță potrivită, câteva fragmente de țesut tumoral. După ce fragmentele tumorale s'au prins bine în chiagul plasmatic, i se adaugă culturii faza lichidă a mediului, compusă de obicei din extractul embrionar diluat și hetero- sau homoser sanguin. Ingrijirea culturii se face prin preschimbarea fazei lichide, schimbare care se practică la 3—8—15 zile după prealabila spălare a culturii cu Tyroide; trecerile se fac la 6—20—30 de zile, câteodată și mai rar.

§ 1439. — Metoda lui Maximov s'a dovedit să fie mai practică. Pe mici lamele de mică sau sticlă se plantează fragmentul tumoral în picătura de mediu plasmatic (faza solidă). Lamela mică se lipește cu

o picătură de apă distilată (sterilă) pe o lamelă mare, care apoi se sigilează cu parafină la o lamă scobită. Peste cultura plantată în faza solidă se poate aplica abil o picătură de fază lichidă.

Culturile confecționate după metoda Maximov se spală și se reînnoesc foarte ușor, prin aceea că la deschiderea culturii lamela mică se ridică de pe lamela mare și se spală ușor în baia Tyrode, apoi i se adaugă culturii faza lichidă. Lamela mică se lipește din nou cu o picătură de apă distilată pe o nouă lamelă mare, care la rândul ei se sigilează pe o lamă scobită. După câteva astfel de reînnoiri, cultura poate fi transplantată.

§ 1440. — Metoda tuburilor rulante. In tuburi cu gâtul îngustat se introduce și se întinde în strat subțire faza solidă a mediului în care se plantează fragmentele tumorale, peste ele se picură faza lichidă a mediului și se introduce amestecul gazos. Cu ajutorul unui dispozitiv special, eprubetele așezate în termostat într'un stelaj special sunt rotite în mod mecanic de 4—5 ori pe oră, ceeace permite spălarea periodică a suprafeței culturilor cu mediul lichid. Culturile din astfel de tuburi nu pot fi examinate direct la microscop sau fotografiate, dar această metodă, prin spălarea continuă a deșeurilor, asigură țesuturilor cultivate o nutriție mai bună.

§ 1441. — Ligneris-Lumsden cultivă țesuturile tumorale numai în faza lichidă a mediului (ser sanguin sau ser sanguin și extract embrionar). Plasma de găină se întrebuințează în cultivarea tumorilor tuturor animalelor, până și a omului. Câteodată ea este amestecată cu serul sau plasma animalului a cărui tumoare se cultivă. Din extractele embrionare, cel mai întrebuințat este extractul embrionar de găină, de vacă (embrion de 2—3 luni), de om. Concentrația extractului embrionar din mediu nu trebue să fie mare (10—30%). Hetero- sau homoserul sanguin se întrebuințează adesea pentru faza lichidă a mediului. Serul uman se poate prepara din sânge placentar, de preferință din aceeași grupă sanguină sau din grupa AB. Concentrația celor 4 componente ale mediului (soluție salină, plasmă, extract embrionar, ser sanguin) variază după nevoie.

Intrebuințarea antibioticelor purificate nu jenează creșterea tumorilor in vitro. Intrebuințarea plasmei și a serului dela omul sănătos pentru cultivarea țesutului tumoral uman nu împiedică creșterea.

§ 1442. — Santesson cultivă tumorile animalelor de laborator în flacoane Carrel: 1 cc de plasmă de găină, diluată 1:3 în Tyrode, cu o pipetă se introduce în flacon și se răspândește pe tot fundul flaconului. Câteva fragmente de țesut tumoral (4—5) sunt plantate în plasmă. Pentru a provoca coagularea, se adaugă 2 picături de extract embrionar de găină, care este răspândit și amestecat pe toată suprafața plasmei. După ce coagularea s'a produs, culturile se spală de două ori câte 1/2 de oră cu 3 cc Tyrode. Apoi lichidul este înlocuit cu 0,5 cc ser de șobolan diluat 1:1 în Tyrode. Flacoanele se capușonează și se țin la temperatura dorită.

§ 1443. — Metoda pentru studiul leucopoezei pe culturi de ţesuturi (A. Timofeevschi şi Benevolenscaia). Prin această metodă s'a putut observa in vitro (în explantate) transformarea limfocitelor în granulocite.

§ 1444. — Limfocitele pentru culturi se procură prin centrifugarea sângelui normal ori leucemic, utilizând chiagul alb. Chiagul alb se fragmentează fără să fie spălat; fragmentele se cultivă în flacoane Carrel, fie în mediul solid, fie în mediul lichid. Mediul solid se compune din plasma donatorului (om) amestecată în părţi egale cu plasma de iepure, ori de găină şi încăodată diluată cu o cantitate egală de lichid Simms (ser ultrafiltrat prin membrane de colodiu). Extractul embrionar nu se întrebuinţează. Mediul lichid se compune din ser uman diluat cu lichid Simms 1 : 2. Prin flacoanele Carrel în care s'a pus mediul lichid se trece serul care conţine 4—5% CO_2. Culturile se observă până la 14 zile.

§ 1445. — Particularitatea metodei constă în felul de a examina culturile (examenul pe frotiuri uscate): cultura în totalitate se scoate din flacon; fragmentul de leucocite însămânţat se debarasează cu un bisturiu de chiagul plasmatic, împreună cu zona de migrare şi zona de creştere. Apoi un fragment însămânţat se ridică şi prin atingere uşoară se fac amprente de lame bine curăţate. După ce frotiurile se usucă la aer, se fixează în May-Grünwald, apoi se colorează cu azur-eozină. Se examinează la imersie. Prin tehnica obişnuită (în preparate totale) puteau fi observate numai elementele zonei de migrare care în mare parte, foarte curând, degenerează. Metoda frotiurilor uscate a lui Timofeevschi ne arată ceeace se petrece în fragmentul însămânţat — locul adevărat al leucopoezei. Metoda lui Timofeevschi şi Benevolenscaia a permis demonstrarea teoriei uniciste a genezei sângelui.

§ 1446. — Metoda pentru studiul osteogenezei (cultivarea în sticle de ceasornic). Pe fundul cutiei Petri de 8 cm diametru se aşează o compresă de tifon peste care se pune o sticlă de ceasornic. Totul se sterilizează. La însămânţare, pe fundul sticlei de ceasornic se pun 10 picături de plasmă de găină şi 10 picături suc embrionar. După ce chiagul este prins, pe suprafaţa lui se depun unul sau mai multe fragmente osoase sau rudimente cartilaginoase. Peste compresa din fundul Petri-ului se toarnă 30 — 40 cc Tyrode, ceeace previne uscarea culturii; Petri-ul se acoperă şi se pune la termostat. După 3 zile, cultura trebue spălată şi trecută pe un mediu nou. In vederea acestei treceri, mai întâi fragmentul însămânţat trebue liberat de zona de creştere şi de plasma învecinată, ceeace se poate obţine parcurgând conturul fragmentului cu vârful bisturiului de iridectomie. După ce fragmentul este dislocat, fără să fie atins cu penseta, se absoarbe cu pipeta largă; apoi se expulzează într'o baie de Ringer (5 minute), de unde se culege din nou tot cu pipeta şi se repune pe un nou chiag plasmatic. Operaţia se repetă.

§ 1447. — Fragmentele cultivate in vitro în felul arătat mai sus pot fi examinate «in toto» şi în secţiuni. Examenul «in toto» arată

dacă fragmentele (segmente osoase) au crescut în comparaţie cu fragmentele martor. Examenul secţiunilor arată felul şi gradul de diferenţiere a ţesutului osos. Fragmentele cultivate se scot din culturi la diferite intervale de timp. Se fixează în Zenker, se spală în apă, se trec în alcool iodat, se colorează cu hematoxilină diluată, se deshidratează, se clarifică în xilen sau ulei de cuişoare şi se montează (în întregime) într'o celulă de sticlă, în balsam de Canada. Fragmentele care urmează să fie secţionate se includ în parafină, se taie în serii, se colorează cu hematoxilină, picrofuxină sau Masson.

§ 1448. — Metoda pentru studiul fagocitozei pe culturi de ţesuturi (Ivanitcaia). Fragmente de ficat de axolotl se cultivă în mediul compus din plasmă de găină hipotonizată pe jumătate şi extract embrionar de găină în proporţie de 2/1. Mediului i se adaugă roşu neutru în concentraţie de 1/50 000. In momentul punerii culturii pe lamelă, la o oarecare distanţă de fragmentul de ficat se pune o mică picătură de suspensie de bacterii.

§ 1449. — Procesul fagocitozei se observă pe culturi vii şi se înregistrează prin cinematografiere. Migrarea leucocitelor începe după 20—30 de minute dela punerea culturii. Fagocitoza începe de îndată ce leucocitele ajung până la bacterii. O celulă poate să fagociteze până la 10 bacterii. Inglobarea unei bacterii durează 1—2 minute. Bacilii nefagocitaţi (intercelulari) nu se colorează cu roşu neutru. Cei fagocitaţi se colorează mai întâi în roz, apoi treptat culoarea se intensifică, bacilii devin roşii, semn că ei sunt morţi. Mai târziu, pe măsură ce digerarea bacilului avansează, nuanţa lui roşie omogenă se turbură; bacilul se fragmentează, fragmentele se izolează şi se pierd în citoplasma fagocitului. Durata procesului de digerare a bacilului variază între 1 — 6 ore.

§ 1450. — Metoda pentru creşterea protozoarelor în culturi de ţesuturi. Cultivarea plasmodiului *Gallinaceum*, în faza exo-eritrocitară, a dat rezultate foarte bune.

§ 1451. — *Tehnica.* Capul şi toracele ţânţarilor infectaţi cu *Plasmodium Gallinaceum* sunt macerate într'o cantitate mică de plasmă heparinată. Suspensia se centrifughează uşor pentru a fi debarasată de fragmente mai mari şi apoi se injectează intravenos găinii. A 8-a sau a 9-a zi, găina este sacrificată; splina este ridicată şi fărâmiţată; fragmente de splină se însămânţează (se cultivă) în flacoane Carrel. Este util să se pună culturi şi din macrofagele sângelui găinii sacrificate. Pentru aceasta, sângele preluat cu o pipetă din inima găinii se pune într'un tub de centrifugă (răcit şi eventual parafinat). După centrifugare, plasma se ridică, iar peste chiagul alb se pun câteva picături de suc embrionar. Chiagul alb consolidat se scoate din tub, se spală, se fragmentează; fragmentele se pun în culturi.

§ 1452. — Mai pot fi cultivate fragmente din ficat, măduva oaselor, creier.

§ 1453. — Fragmentele pot fi cultivate în: tuburi rulante (ceeace prezintă multe desavantaje), în flacoane Carrel şi pe lamelă. In flacoane Carrel (de 5—6 cm diametru) se introduc 4—5 lamele mici care se dispun pe fundul flaconului la distanţă una de alta. Cu o pipetă Pasteur se pune sub fiecare lamelă câte o picătură de plasmă şi apoi o picătură de suc embrionar, ceeace fixează lamela de fundul flaconului. Peste fiecare lamelă se pune câte o picătură de plasmă, iar fragmentul de ţesut este cufundat în picătura de plasmă. Imediat după aceasta se absoarbe cu o pipetă prisosul de plasmă, aşa încât fiecare fragment are sub el câte un strat foarte subţire de plasmă. Flacoanele rămân la temperatura camerei o oră, în care timp plasma se consolidează bine. Apoi fiecărei culturi i se adaugă mediul lichid compus din: 20% ser de găină procurat prin puncţie cardiacă, 7% (sau mai puţin) extract embrionar, roşu fenol 0,05%, Tyrode 73%, penicilină 5 unităţi cc de mediu. Mediul lichid se preschimbă la fiecare 4—5 zile. Culturile se examinează la obiectiv mic prin fundul flaconului Carrel. După termenul dorit culturile se scot din flacon, se fixează o oră în alcool metilic. Colorare în Giemsa 10% timp de o oră. Preparatele se spală, se usucă, se montează în balsam neutru. Preparatele mai pot fi colorate şi cu hematoxilină Delafield apoi deshidratate, clarificate în xilol şi montate în balsam neutru.

§ 1454. — Culturile pe lamelă în picătură suspendată se fac în mediul compus din părţi egale de plasmă şi suc embrionar. Această metodă necesită transplantarea culturilor, ceeace adesea duce la pierderea culturilor (infectarea).

§ 1455. — **Cultivarea virusurilor pe culturi de ţesuturi**

a) *Cultivarea în tuburi rulante.* Mediul (faza solidă) este compus din ser uman procurat din placentă 40%; extract embrionar bovin 10%; soluţie salină 10%; plasmă de găină 40% .

In faza lichidă mediul are aceeaşi compoziţie minus plasma.

In fiecare tub se cultivă mai multe fragmente (20) de ţesut ales. După ce culturile au crescut li se adaugă câteva picături din emulsia salină preparată din creierul animalului infectat cu virusul respectiv. Pentru examinarea culturilor vii cu imersia, culturile se explantează pe lamele (40/45 mm) în picătură culcată.

Modificările citopatologice specifice virozei apar în celulele noi, crescute în culturi. Prin treceri, virusul poate fi menţinut timp îndelungat în culturi.

§ 1456. — *Cultivarea pe lamelă.* Fragmente de rinichi sau de cornee sunt cultivate în picătură de plasmă-suc embrionar (părţi egale) pe lamelă (metodă clasică). Când se obţine o bună creştere epitelială sub forma unei membrane epiteliale, atunci se face infectarea culturilor epiteliale cu centrifugatul emulsiei membranei corio-alantoide pe care s'a cultivat virusul respectiv sau cu centrifugatul emulsiei tisulare (creier, ficat, splină) a animalului infectat.

In celulele epiteliale crescute pe lamelă apar incluzii specifice cirozei, care se pun bine în evidenţă când preparatele sunt fixate în acid osmic sau sublimat şi colorate cu Giemsa, Mallory, hematoxilină ferică.

Metoda pentru dediferenţierea celulelor în culturi de ţesuturi

§ 1457. — Mai întâi se obţin pe lamele culturi de celule epiteliale într'un mediu plasmatic bogat în trefone şi în oxigen; plasma trebue să fie bine întinsă pe lamelă. In astfel de mediu celulele cresc abundent, dar se diferenţiază. Apoi culturile dediferenţiate se lasă timp de 3—7 zile la temperatura de 28—30°, în mediul care conţine extract placentar. Extractul placentar se prepară din placenta unei iepuroaice gravide de 2—3 săptămâni, amestecată cu Ringer bicarbonatat în cantitate de cinci ori volumul placentei.

§ 1458. — **Pentru studii de histogeneză** se recomandă medii care conţin puţin suc embrionar. De exemplu, cultivând în anumite condiţii celulele mezenchimale provenite din pericondrul embrionar se poate obţine în culturi formarea condrinei, celulelor cartilaginoase şi osoase. Condiţiile cerute sunt următoarele: în flacoane Carrel mici se introduc 0,5 cc plasmă, 1 cc Tyrode şi o picătură extract embrionar; înainte ca amestecul să se prindă în chiag, se introduc în flacon fragmente de ţesut. După ce chiagul plasmatic s'a prins, în flacon se introduc 3 cc Tyrode, care se menţin deasupra culturii timp de 1 oră la temperatura camerei, apoi se aspiră. Flacoanele se capuşonează şi se pun la 37° pentru 2—3 zile, după care timp se spală din nou cu 3 cc Tyrode timp de 1 oră la temperatura camerei. Lichidul aspirat se înlocueşte cu 0,5 cc plasmă fluidă; culturile se pun la termostat pentru 3—4 ore, apoi plasma se aspiră şi culturile se repun la termostat pentru 2—3 zile.

§ 1459. — Pentru cultivarea ţesuturilor, în afară de medii naturale (plasmă, ser, extract embrionar) şi cele sintetice (soluţii saline), se mai poate întrebuinţa şi « mediul viu », membrana corio-alantoidă, ceeace intră în explantarea in vivo. Studiţchi descrie această avantajoasă tehnică, care permite cultivarea celor mai variate ţesuturi.

TEHNICI CITOLOGICE ŞI HISTOLOGICE APLICATE IN MEDICINA LEGALĂ

§ 1460. — Medicina legală a încetat de a mai fi o disciplină empirică. Ea utilizează din ce în ce mai mult progresele făcute de ştiinţele naturii şi metodele de cercetare ale acestora.

Rapoartele medico-legale, aproape în totalitatea lor, îşi bazează concluziile pe rezultatele unei metode de laborator.

Anatomia patologică ocupă unul din locurile cele mai importante în cercetarea ştiinţifică medico-legală.

Pentru medicul legist modern, cunoştinţele de anatomie patologică au devenit mai mult decât o necesitate. El trebue să posede un minimum de tehnici histologice, cu ajutorul cărora să-şi poată studia materialul pe care i-l oferă expertiza.

§ 1461. — Aceste tehnici au fost expuse la capitolele respective, aşa că nu mai revenim asupra lor. Ele sunt comune cu cele întrebuinţate în studiul anatomiei patologice.

Totuşi, medicina legală are unele capitole care necesită tehnici speciale de cercetare ştiinţifică, aşa cum este studiul petelor şi al părului. Se cunoaşte importanţa deosebită a cercetării petelor şi a firelor de păr în rezolvarea multor probleme dificile din unele cazuri şi în care formularea concluziilor definitive şi cu valoarea ştiinţifică depinde numai de expertiza petelor sau părului.

§ 1462. — In afară de reacţiile chimice sau metodele fizice de cercetare în expertiza petelor, este nevoie de cele mai multe ori şi de un examen citologic pentru precizarea diferitelor detalii pe care justiţia le cere medicului expert. Studiul citologiei petelor, ca şi studiul structurii firelor de păr, necesită tehnici oarecum deosebite şi cu anumite particularităţi specifice.

§ 1463. — Inainte de a trece la metodele de coloraţie, socotim că este necesar să consacrăm un capitol aparte metodelor de recoltare, de conservare şi expediere a materialului medico-legal pentru expertiză.

§ 1464. — Recoltarea materialului pentru histopatologie. Considerăm ca foarte necesară inserarea acestui paragraf, deoarece şi astăzi mulţi medici trimit materialul de expertiză sub forma unor bucăţi mari de organe puse în borcane, acoperite cu hârtie, fără niciun fel de soluţie fixatoare şi cerând sentenţios şi urgent examenul histopatologic. Fragmentele astfel trimise ajung la laboratorul de anatomie patologică într'o stare de putrefacţie atât de avansată, încât de foarte multe ori vara se găseşte în borcanul trimis un adevărat terci sau o pastă.

§ 1465. — Fragmentele destinate examenului histopatologic vor avea dimensiunile de 2 cm lungime şi lăţime şi 0,5 cm grosime. Vor fi alese din părţile cele mai caracteristice ale organului respectiv. Se vor recolta în acelaş timp mai multe fragmente dintr'un organ şi din zone diferite.

§ 1466. — Cantitatea de fixator va ocupa un volum mult mai mare decât fragmentele prelevate. Fixarea se va face în formol preparat după formula menţionată la capitolul « Fixatorilor » sau alcool de 96° pentru unele colorapii speciale.

§ 1467. — Pe borcan se va aplica o etichetă, care va avea scrise toate indicaţiile necesare pentru identificarea conţinutului. Astfel se vor menţiona localitatea de unde provine materialul, data morţii şi data autopsiei, numele, organele din care s'au prelevat fragmentele, semnătura medicului. Borcanul cu fragmentele va fi închis ermetic

şi sigilat de magistratul care a asistat la autopsie. Cu o adresă explicativă, aceste borcane sunt trimise laboratoarelor şi vor fi deschise numai de persoanele însărcinate cu facerea examenelor respective.

§ 1468. — **Recoltarea petelor** de sânge sau de spermă comportă aceleaşi manopere de recoltare şi expediere la laborator.

Petele se ridică de obicei cu suportul lor. Este de observat însă faptul că sunt suporturi care pot fi ridicate, iar altele care, fie din cauza naturii lor (duşumea, tavan, zid, etc.) sau a volumului lor (mobile) nu pot fi transportate. In acest caz se detaşează pata suspectă prin mijloacele cele mai potrivite, ca: desfacerea porţiunii pătate sau răzuirea.

§ 1469. — Pentru ca examenul de laborator să nu fie îngreunat sau chiar denaturat în ceeace priveşte rezultatul, este necondiţionat nevoie să se ia toate măsurile de protejare şi conservare a petelor. Suporturile cu petele suspecte vor fi astfel împachetate încât petele să nu se şteargă, să sufere o alterare prin frecare, mototolire sau datorită condiţiilor atmosferice sau ale mediului în care se păstrează. După ce s'a efectuat împachetarea în condiţiile amintite a suporturilor cu petele suspecte, se aplică pe pachet etichete cu toate indicaţiile respective şi cu o adresă explicativă sunt trimise laboratoarelor de specialitate.

§ 1470. — In cazul petelor de sânge, dacă sângele este lichid, este colectat într'o sticlă ermetic închisă şi se fac în acelaş timp mai multe frotiuri pe lame. Impachetarea se face de obicei în hârtie albă sau în vată, după natura suportului, după care se pun între două bucăţi de carton şi apoi aşezate într'o cutie.

§ 1471. — Ridicarea petelor prin tehnica lui Taylor. In realizarea acestei metode ne servim de o foaie de hârtie sugătoare de culoare albă şi imbibată cu apă distilată. Se aplică această foaie astfel preparată pe pata de examinat. Prin imbibiţie, pata de sânge se dilucază şi impregnează hârtia sugătoare. Nu suntem partizanii acestei metode, deoarece procedeul alterează elementele anatomice ale sângelui sau eventualele celule detaşate din ţesuturile şi organele din care s'a scurs sângele. O pată de sânge prelevată prin metoda Taylor nu poate fi supusă unui examen citologic, aşa că în ceeace ne interesează devine inutilizabilă, fiind totuşi posibile examenele fizice şi chimice ale petei.

TEHNICI PENTRU SÂNGE

§ 1472. —Pentru a izola şi examina eritrocitele, pata de sânge trebue disolvată. Se cunosc mai multe lichide de disoluţie.

§ 1473. — Serul sângelui ar constitui lichidul optim de disoluţie. Serul prezintă însă desavantajul că ar putea să conţină în suspensie eritrocite.

Lichidele mai obişnuit întrebuinţate în laborator sunt următoarele: *a)* lichidul lui Virchow se compune din 30 părţi hidroxid de potasiu şi 70 părţi apă distilată; *b)* lichidul lui Roussin conţine glicerină 3 părţi, acid sulfuric concentrat 1 parte şi apă distilată 1 parte; *c)* un alt lichid tot cu bază de glicerină are următoarea formulă: glicerină 90 g apă distilată 0,10 g, clorură de sodiu 0,20 g, sublimat 0,10 g; *d)* lichidul lui Vibert are următoarea formulă; biclorură de mercur 0,5 g, clorură de sodiu 2 g, apă distilată 100 cc; *e)* lichidul lui Babeş este o soluţie alcoolico-potasică de albastru de metilen, saturată.

§ 1474. — **Izolarea eritrocitelor.** Dacă pata este recentă, se disolvă o parte din ea în soluţie salină fiziologică, în care apar destul de repede eritrocitele. Dacă pata este mai veche şi uscată, se desface din ea o crustă sau o porţiune, cu suport cu tot, care se pune pe o lamă de sticlă. Cu o pipetă se picură câteva picături din lichidul de disoluţie. Lichidele de disoluţie au proprietatea de a păstra forma şi caracterele globulelor. Dacă pata nu este foarte veche, este suficientă o macerare de 2—3 ore. In cazul în care o pată este foarte veche, macerarea poate dura chiar şi 2 zile. Cu un agitator de sticlă se destramă suportul şi se izolează astfel părţile insolubile care se detaşează.

Preparatul astfel făcut se pune la microscop, se numără globulele, se notează forma şi culoarea lor şi li se măsoară diametrul.

§ 1475. — In laboratoarele mari şi bine utilizate, acest procedeu este abandonat în aplicaţiile medico-legale, deoarece suportul examinat nu este totdeauna plan, ceeace face practic imposibilă punerea la punct a microscopului cu un obiectiv puternic.

In al doilea rând, rezultatele sunt valabile numai dacă eritrocitele sau o parte din ele şi-au păstrat perfect forma. Rezultatele astfel obţinute nu pot reprezenta valori absolute în formularea concluziilor.

Am menţionat totuşi această metodă, ca fiind foarte simplă şi posibilă în orice loc unde se află un microscop. Chiar dacă nu dă rezultate cu valoare absolută, ea permite totuşi uneori o orientare preţioasă expertului.

§ 1476. — **Tehnica lui Royas** se bazează pe principiul că examenul microscopic al petelor de sânge se face pe un suport opac. Lăsată uitării un timp, îşi recapătă o oarecare importanţă odată cu apariţia ultropaculuĭ. Ca fixator se întrebuinţează alcoolul absolut, iar pentru colorat se întrebuinţează soluţia Giemsa. Din soluţia Giemsa-mamă se face o baie în care se pune 1 picătură de soluţie-mamă pentru fiecare centimetru cub de apă distilată neutră.

§ 1477. — *Tehnica* : 1) fixarea petei în alcool absolut timp de 20 de minute; 2) colorare cu Giemsa 1 minut; 3) spălare cu apă distilată neutră; 4) uscare cu hârtie de filtru şi montare în balsam de Canada; 5) examinarea preparatului la ultropac.

Este deasemenea o metodă cu valoare de orientare.

§ 1478. — **Metoda lui Alvarez de Toledo y Valero.** Principiul acestei metode se bazează pe cercetarea aspectului granulaţiilor din leucocitele sângelui. El întrebuinţează metoda diascopiei a lui Dominici pe fibrele dilacerate de stofă, care permite colorarea granulaţiilor din leucocite. După aspectul granulaţiilor se poate arăta dela ce animal provine sângele.

Astfel: leucocitele cu granulaţii amfofile caracterizează sângele de cobai şi de iepure. Limfocitele cu corpusculii lui Kurloff sunt caracteristice sângelui de cobai. Granulaţii eozinofile deosebit de mari se găsesc în sângele de măgar, cal şi catâr.

Avantajul metodei este acela că, în condiţii optime, permite diferenţierea sângelui de om, de cel animal.

Metode pentru determinarea originii petelor de sânge

§ 1479. — Principiul acestor metode este de a face diagnosticul regiunii corpului din care provine sângele care a produs pata. Acest sânge poate să provină dintr'un vas rupt sau dintr'o cavitate naturală, ca: vaginul, fosele nazale, căile digestive sau respiratorii. Justiţia are neapărată nevoie în unele cazuri să cunoască proveniența petelor de sânge şi în acest scop examenul citologic al petelor este extrem de util.

§ 1480. — **Tehnică pentru examenul petelor de sânge menstrual şi al petelor obstetricale.** Se ia un fragment de pată şi se pune la macerat într'o sticlă de ceasornic, cu o cantitate minimă de apă distilată, circa X picături. Cu ajutorul unui ac se detaşează pata de pe suport. Se etalează pe lamă o picătură din lichidul în care s'a macerat pata şi se fixează cu alcool-eter 5 minute; se colorează cu hemateină 2—3 minute; se spală cu apă, apoi virare în apă, până ce preparatul ia o culoare albastră; colorare cu eozină 1%; spălare cu apă; uscare şi examinare la imersie.

§ 1481. — Sângele menstrual se caracterizează prin prezenţa de placarde epiteliale, detaşate din mucoasa uterină şi care apar sub formă de lamele plate, cu un nucleu central voluminos şi rotunjit şi de cele mai multe ori cu marginile îndoite. Când eritrocitele sunt prea numeroase şi încurcă cercetarea celulelor epiteliale, ele se hemolizează adăugându-se la lichidul de macerație o picătură de acid acetic.

§ 1482. — In sângele provenit dela un viol nu se găsesc celule uterine, ci celule de origină vulvară, iar sângele este amestecat foarte adeseori cu spermă. Celulele de origină vulvară nu se aglomerează în placarde şi au un nucleu voluminos şi alungit.

§ 1483. — Petele obstetricale conţin meconiu, resturi placentare, peri fetali, sânge.

§ 1484. — In lipsa hemateinei, aceasta poate fi înlocuită cu albastru de metilen sol. 1%.

§ 1485. — **Procedeul coloraţiei imediate** este indicat în cazul petelor care imbibă ţesuturile. Coloranţii întrebuinţaţi sunt hemateina şi eozina.

Tehnica : se detaşează un fragment de ţesut impregnat cu sânge şi se fixează în alcoolul absolut. Colorare cu hemateină-eozină, montare în balsam de Canada.

§ 1486. — **Procedeul includerii în parafină sau celoidină** este recomandat mai ales atunci când sângele din pată este amestecat cu fragmente din diferite ţesuturi (ţesut cerebral, etc.).

Includerea în parafină. Se tratează fragmentele respective timp de câteva ore cu o soluţie de NaCl 6%, după care se fixează în formol 10% timp de o oră. După fixare se practică includerea după procedeul histologic obişnuit.

Includerea în celoidină. Se fixează materialul timp de câteva minute cu alcool-eter. După fixare se ţine câteva ore în celoidină lichidă şi apoi în celoidină densă câteva zile. Capsula plină de celoidină se pune într'un recipient care conţine cloroform şi după 24 de ore se obţin blocuri întărite.

Secţiunile se fac la microtom şi se colorează prin metodele obişnuite, fiind utilizată mai frecvent metoda de coloraţie cu hematoxilină-eozină. Prin această metodă, în afară de elementele citologice şi tisulare, se pot studia şi leucocitele.

§ 1487. — **Procedeul transferului** are de scop tot studiul elementelor citologice. Acest procedeu cuprinde două grupe de metode care pot fi întrebuinţate:

1. In prima metodă se pun pe o lamă câteva particule de pată, care se reduc la o pulbere fină, urmată de o impregnare cu albumină glicerinată. Se fixează în alcool absolut 5 minute. Se colorează cu hemateină-eozină. Montare în balsam de Canada.

2. Al doilea grup cuprinde mai multe metode. Principiul acestui grup constă în etalarea pe pată a unei soluţii de celoidină sau de colodiu în alcool-eter; în acest caz, după uscarea soluţiei se va forma o peliculă în care sunt incluse elemente celulare şi sanguine.

Se utilizează în mod obişnuit o soluţie de celoidină de 8% într'un amestec în părţi egale de alcool şi eter şi pelicula se detaşează după 24 de ore.

După fixarea în formol 10% (fixarea nu este obligatorie), se colorează pelicula cu Giemsa sau cu hemateină-eozină. Montare în balsam de Canada.

§ 1488. — In ceeace priveşte globulele roşii, ele pot să fie confundate cu sporii de ciuperci. Pentru diagnosticul diferenţial, se adaugă o picătură de acid acetic 5%, care face să dispară globulele roşii, păstrând intacţi sporii şi grăsimea.

In cazul unor eritrocite nucleate, nucleii acestora rămân intacţi după acţiunea acidului acetic 5%.

Acelaş proces se întâmplă dacă în loc de acid acetic se întrebuinţează o picătură de soluţie de chinină 1‰. Procedeul serveşte la diagnosticul diferenţial între eritrocitele nucleate şi cele anucleate. Soluţia de Lugol colorează mai intens sporii decât nucleii eritrocitelor.

§ 1489. — **Metodă de diagnostic specific al petelor de sânge.** O bucăţică din stofa cu pată se tratează ca orice secţiune făcută la microtom, executându-se următorii timpi: 1) fixare în alcool absolut 20—30 de minute. Acest fixator fixează sângele pe trama stofei; 2) alcool de 95° 1 minut; 3) alcool de 70° 1 minut; 4) spălare în apă distilată; 5) colorare în hematoxilină, preferându-se soluţii de 0,10%; dacă ţesutul este subţire, fragmentul se ţine 10 minute. Dacă ţesuturile sunt groase sau este vorba de o pată veche, se întrebuinţează o soluţie de hematoxilină de 0,05 sau 0,03%. In această soluţie şi depinzând de vechimea petei se poate ţine piesa timp de câteva ore; 6) spălare în apă timp de 5—10 minute; 7) colorare cu soluţie apoasă de eozină 1%, timp de 2—3 minute; 8) trecere în alcool de 70° timp de 1—2 minute; 9) trecere în alcool de 95° timp de 1—2 minute; 10) trecere în alcool absolut timp de 2 minute; 11) benzen; 12) montare în balsam de Canada.

Această metodă de colorare permite punerea în evidenţă a numeroase leucocite, prin colorarea nucleilor lor în violet-închis. Tot prin această metodă se pot pune în evidenţă şi formele de leucocite şi chiar permite evidenţierea unui sânge leucemic.

§ 1490. — Fără fixare se poate colora materialul petei timp de trei minute cu soluţia May-Grünwald; spălare şi apoi colorare timp de 15—20 de minute cu soluţia Giemsa.

§ 1491. — Metodele mai sus menţionate nu au valoare absolută, ele servind doar ca metode de orientare. De când s'au perfecţionat metodele biologice şi cristalografice de cercetare a petelor de sânge, probele morfologice se întrebuinţează din ce în ce mai puţin. Totuşi, am găsit necesar să dăm aceste metode de cercetare, pentrucă ele pot fi extrem de utile acolo unde lipsesc condiţiile optime pentru metodele biologice, spectroscopice sau cristalografice.

METODE MORFOLOGICE PENTRU STUDIUL PETELOR DE SPERMĂ

§ 1492. — Procedeele de recoltare, păstrare şi expediere a petelor de spermă sunt aceleaşi ca şi pentru petele de sânge.

Scopul metodelor morfologice în cazul petelor de spermă este acela de a pune în evidenţă spermatozoidul sau eventualele elemente citologice care ne pot indica origina presupuselor pete de spermă. Acestea pot fi cruste de puroi, mucozităţi nazale, etc.

§ 1493. — **Procedeul macerăţiei.** Prepararea petei pentru examen. Se desface un fragment din partea mai groasă a suportului petei, se pune pe o lamă de sticlă şi se imbibă încet cu apă distilată, picătură

poate dura până la 24 de ore. Produsul de macerare se poate ridica de pe suport prin două procedee: prin răzuire sau prin disociere.

Procedeul prin răzuire are desavantajul că acțiunile mecanice pot rupe spermatozoidul la nivelul gâtului, făcând în felul acesta preparatul impropriu unei bune interpretări. Procedeul disocierii constă în desfacerea unei fibrile a suportului, care se disociază apoi în lichidul de macerație.

Este de preferat ca prepararea macerației să se facă într'un mic tub de sticlă, terminat cu o parte capilară. După ce s'a terminat macerația, soluția este centrifugată și se colectează apoi depozitul dela fundul tubului.

Când suportul este de catifea, pluș sau stofă păroasă, se rad perii cu crustele de pete și se macerează.

Se întinde pe lamă o picătură din produsul de macerație, se usucă la o temperatură moderată și apoi se fixează prin căldură.

Colorarea preparatului: se recomandă pentru acest scop soluția iodo-iodurată, eozina, hematoxilina, sau soluția apoasă de albastru de metilen. După ce s'a acoperit produsul de macerație cu o lamelă, se examinează la microscop cu obiectiv 6 sau cu imersie. Privit pe fața concavă, spermatozoidul apare cu capul conturat de substanța colorantă care a fost întrebuințată și cu partea superioară mai deschisă decât cea inferioară. Privit pe fața convexă, partea mai deschisă a capului prezintă în mijloc o vacuolă.

Spermatozoidul se poate identifica și fără a fi colorat, dar în acest caz poate fi găsit intact numai foarte rar.

O interpretare pozitivă a petei nu poate fi dată decât atunci când pe preparatul microscopic se pot pune în evidență cel puțin 1—2 spermatozoizi întregi.

§ 1494. — Procedeul căutării directe. Această metodă se întrebuințează în cazul suporturilor care prin macerație nu detașează un număr suficient de spermatozoizi și la care răzuirea poate să deterioreze elementul anatomic al spermei.

§ 1495. — Principiul metodei constă în posibilitatea colorării spermatozoizilor direct pe pată cu un colorant care nu-i distruge, prin disocierea fibrelor suportului și montarea lor pe un preparat microscopic.

Tehnica : o fibră din țesutul impregnat de pată se tratează timp de 30—60 de secunde cu o soluție amoniacală de eritrozină 0,5 g %. Fibra astfel tratată este spălată cu apă și disociată pe lamă. Se usucă și se adaugă apoi o picătură de balsam de Canada. Se acoperă cu lamelă.

Spermatozoizii apar colorați în roșu-aprins și grupați în ciorchine pe fibrele de țesuturi.

§ 1496. — Un alt procedeu de căutare directă este următorul: se colorează fibra cu o soluție amoniacală de eritrozină 0,5%; se disociază fibra în albastru de metilen. Fibrele desfăcute se spală în albastru

de metilen 0,05 %. După ce disocierea fibrei s'a terminat, se aspiră soluția colorată cu hârtie de filtru și se înlocuește cu apă distilată care se reînnoește de mai multe ori. Se acoperă lama și fibrele cu o sticlă de ceas, pentru ca să se usuce. Trebue evitați curenții de aer și manipulațiile inutile. După uscare, montare în balsam de Canada.

Sub acțiunea dublei colorații, spermatozoizii își pierd refrigența și apar colorați în violet, iar fibrele țesutului apar colorate în albastru-deschis.

Pentru a distruge fibrele țesutului suport, Grigorjew tratează pata cu acid sulfuric concentrat.

Cercetarea directă a spermatozoizilor dintr'o pată suspectă este singurul element de certitudine al expertizei medico-legale.

§ 1497. — Procedeu pentru petele care se găsesc pe lemn. Când este vorba de un parchet ceruit, se detașează cu un ac o scuamă din pată și se colorează prin metoda directă.

Dacă însă este vorba de o pată care se găsește pe o scândură cu suprafața neregulată, se detașează cu ajutorul unei pense o fibră de lemn pe care se găsește pata. Se colorează prin metoda directă, însă nu se disociază, ci se spală și se montează în balsam de Canada.

§ 1498. — Procedeu pentru petele care nu se pot prelevа. In cazul când este imposibil să prelevăm pata cu o bucată de suport, existând riscul de a o distruge, (petele se găsesc pe corpuri opace, pietre, marmură, etc.) se întrebuințează metoda identificării in situ a petelor de sperma.

Tehnica me.odei. Direct pe suport se procedează în felul următor: 1) fixare cu alcool absolut timp de 20 de minute; 2) colorare cu Giemsa 30 de minute (1 picătură de soluție Giemsa la 1 cc de apă distilată neutră); 3) uscare cu hârtie de filtru și montare în balsam de Canada.

Preparatul se examinează la ultropac. Examenul microscopic, oricare ar fi tehnica întrebuințată, se va face cu un obiectiv destul de puternic.

Se vor recunoaște pe preparat: fibrele de țesut slab colorate în albastru azur, pe care se pot distinge spermatozoizii puternic colorați în violet sau roșu-viu, deseori grupați în grămezi. Cu un măritor mai puternic se va căuta capul spermatozoidului colorat în violet foarte intens. Coada spermatozoidului este colorată în albastru până la extremitatea sa. In afară de spermatozoid, examenul unei pete de sperma poate permite uneori punerea în evidență a celulelor de descuamare din tubii seminiferi, granulații de natură albuminoasă, globule de lecitină, concrețiuni prostatice, granulocite și microbi.

Valoarea metodei. Prezența spermatozoizilor într'o pată permite să afirmăm cu certitudine că aceasta este constituită din sperma. Spălatul suportului nu determină dispariția spermatozoizilor din pată, ci dimpotrivă, se produce o adevărată fixare a elementelor pe fibrele de stofă, fixare care se întrebuințează uneori (încălzirea în apă săpunoasă) pentru a găsi în mod sigur spermatozoizii pe pete.

Metodele care au fost propuse pentru colorarea efectivă a spermatozoizilor sunt destul de numeroase. Redăm pe cea mai importantă.

§ 1499. — Impregnarea argentică a spermatozoizilor este o altă metodă utilizată; 1) fixarea unei porțiuni din pată timp de 24 de ore în formol 5%; 2) spălare; 3) ședere timp de 6 ore în soluția de nitrat de argint 3%, pus la etuvă de 50°; 4) spălare; 5) reducere timp de 6—7 ore într'un amestec de hidrochinonă, sulfit de sodiu și piridină; 6) spălare. Montare în balsam de Canada.

Spermatozoizii au capul colorat în brun, înconjurați de o zonă incoloră. Coada se colorează în brun-clar. Preparatele se mențin mult timp prin această colorație.

Se poate aplica la spermă și colorația lui Bielschowsky.

§ 1500. — **Colorația cu croceină.** Ca reactiv se întrebuințează soluția de croceină saturată. Tehnică: 1) se decupează un mic lambou de țesut și se macerează în puțină apă distilată; 2) disociere cu ácele. Macerarea trebue să fie urmărită uneori timp de 1 sau 2 ore; 3) colorarea cu croceină; 4) studiul microscopic la imersie.

§ 1501. — **Colorația cu hematoxilină eozină**: 1) uscarea preparatului după macerație; 2) fixarea în alcool sau în sublimat; 3) colorare cu hemateină timp de 5 minute; 4) spălare cu apă; 5) colorare cu eozină timp de câteva secunde; 6) spălare cu apă; 7) deshidratare în alcool absolut, xilen, balsam.

§ 1502. — **Metoda Baecchi.** Principiul metodei constă în întrebuințarea mai multor soluții colorante, după cum este culoarea stofe suport.

Se recurge în mod obișnuit la 3 soluții colorante:

a) Soluție de fuxină acidă 1% 1 parte, acid clorhidric 1% 40 părți.

b) Soluție de albastru de metilen 1% 1 parte, acid clorhidric 1% 40 părți.

c) Soluție mixtă preparată din fuxină acidă 1% 1 parte, albastru de metilen 1% 1 parte, acid clorhidric 1% 40 părți.

Tehnica de colorare: 1) se taie un fragment de 1 cm² din țesutul îmbibat de pată; 2) se colorează 30—60 de secunde cu unul din reactivii menționați mai sus, avându-se în vedere la alegerea acestuia culoarea țesutului suport. Decolorare cu acid clorhidric 1%; 3) spălare; 4) deshidratare cu alcool absolut; 5) trecere în xiloluri; 6) montare în balsam de Canada, punându-se în sus suprafața mai bogată a materialului de examen și care se recunoaște prin colorarea sa mai intensă.

Spermatozoizii apar prin această metodă colorați în roșu sau în albastru, după cum se întrebuințează amestecul de fuxină-albastru de metilen. Capul este colorat în roșu și cozile în albastru.

Dacă petele sunt vechi, înainte de colorare sunt lăsate în apă distilată până la 24 de ore sau, în cazul când sunt foarte vechi, apa distilată se înlocuește cu soluție amoniacală de 20—30%, după care urmează spălarea în apă distilată.

Această metodă de colorație este electivă pentru spermatozoid și ne permite în mod sigur punerea în evidență a acestuia, atunci când există.

§ 1503. — **Metoda Perrando** se aplică la expertiza petelor de spermă de pe pânzeturi și stofe groase. Prepararea coloranților: Amestecul I: apă amoniacală 3% 100 cc, eozină, albastru de metilen sau albastru de toluidină 2 g.

Amestecul II: gumă arabică pură 30—40 g, apă distilată 100 cc, zaharoză 10—20 g, albumină 2 g.

Tehnica : se decupează din rufăria pătată fâșii de 1 cm lungime și 5 milimetri lărgime; 2) se adună aceste fâșii în mici pachete, în așa fel încât fețele pătate să se atingă; 3) colorarea acestor pachete timp de 24—48 de ore în amestecul I; 4) spălare timp de 24 de ore într'o apă amoniacală slabă, în care se lasă să înnoate pachetul de fâșii; 5) se desface după aceasta pachetul și se secționează fâșiile în două jumătăți egale; 6) fiecare jumătate astfel obținută se aplică pe o lamă, fața pătată fiind aplicată de sticlă cu ajutorul amestecului II; 7) după o zi se pot ridica straturile superficiale ale țesutului prin radere; 8) se adaugă apoi câteva picături de apă amoniacală; 9) se adaugă în sfârșit soluție gomoasă (II) și se acoperă cu o lamelă. Spermatozoizii se colorează în albastru.

§ 1504. — O altă metodă folosită pentru petele de pe stofe este următoarea.

Prepararea coloranților: soluția *A* : hematoxilină sol. 1% 3—5 cc în alcool absolut; soluția *B* : acid picric 1—5 g, apă distilată 120 cc, perclorură de fer 5 g; soluția *C* este o soluție iodurată de 8—12%, X picături; soluția *D* : soluție apoasă saturată la rece de acid oxalic, soluție apoasă de acid picric 10 cc, acid tanic 1 cc, alcool de 96° 100 cc.

Tehnica de colorare: 1) se taie din țesutul suspect fragmente de 4—5 cm²; 2) se mordansează timp de 6—24 de ore într'o soluție de rezorcină 10%; 3) se colorează într'un tub Borrel plasat pe baia de apă timp de ½ oră în soluția colorantă formată din amestecul soluțiilor *A*, *B* și *C*, în proporțiile următoare: se amestecă câte 3—5 cc din soluția *A* și *B*, la care se adaugă apoi 10 picături de soluție *C*; 4) se diferențiază timp de 3—4 minute până la colorarea cenușie a fragmentelor, în soluția *D*; 5) se spală cu apă de fântână; 6) se disociază câteva filamente în apă sau glicerină; 7) montare în glicerină.

Spermatozoizii se colorează în negru.

Metoda aceasta este mai puțin practică decât metoda directă sau metoda cu hemateină-eozină, deoarece este destul de laborioasă, necesitând preparări de amestecuri, multe ingrediente și mai ales, un timp destul de îndelungat pentru obținerea rezultatelor cerute rapid.

Metoda rămâne valabilă pentru cercetări minuțioase și pentru cazul în care celelalte metode nu au putut pune în evidență spermatozoizii.

§ 1505. — Tehnică pentru petele de spermă depuse pe lemn: 1) se detașează o fibrilă de lemn; 2) se colorează fără să se disocieze, cu

[illegible] preparației și montarea în balsam.

§ 1506. — Punerea în evidență în sperma a celulelor vaginale. Principiul metodei se bazează pe punerea în evidență a conținutului în glicogen din celulele vaginale, cu Lugol.

Colorantul de bază este Lugolul, preparat: iod metalic 0,2 g, iodură de potasiu 0,3 g, apă distilată 45 cc. Se întrebuințează numai în stare proaspătă.

Preparatele de pată făcute prin metodele menționate mai sus se tratează cu o soluție diluată de Lugol care colorează în cafeniu granulele de glicogen.

Aceasta reprezintă de fapt o metodă histochimică aplicată la studiul petelor de spermă.

Ținem să remarcăm, ca fiind de o importanță deosebită, faptul că metodele morfologice în studiul petelor de spermă au în expertiza medico-legală o valoare cu mult mai mare decât metodele cristalografice.

Punerea spermatozoizilor în evidență prin metodele menționate mai sus constitue criteriul de certitudine pentru diagnosticul petei de spermă.

EXPERTIZA PETELOR DE LAPTE ȘI COLOSTRU

§ 1507. — M. Kernbach. Când este vorba de o secreție mamară proaspăt recoltată dimineața, se etalează pe o lamă a doua sau a treia picătură de secreție. Pe acest frotiu se face coloratia May Grünwald-Giemsa, după tehnica menționată la capitolul respectiv.

Când este vorba de pete de lapte sau de colostru, se macerează pata suspectă în soluție salină fiziologică. Din produsul de macerație se etalează o picătură pe lamă și se colorează cu May Grünwald-Giemsa.

Examenul microscopic al unui astfel de preparat permite să se pună în evidență următoarele elemente citologice: 1) celule epiteliale, cum sunt celulele lactogene inițiale sau lactoblastele, cu aspectele lor variate de prelactocite și lactocitele dela care se vor forma corpusculii muriformi; 2) granulocitele, în special neutrofilele și eozinofilele, care sunt destul de abundente pospartum și postabortum.

Citologia secreției mamare se modifică în cursul gestației postpartum și postabortum.

Studiul secreției mamare și în special al colostrogramei nu se poate face în condiții utile decât prin elementele sale celulare.

In ultimul timp, colostograma pare să aducă servicii importante în expertiza medico-legală a avorturilor și mai ales pentru diagnosticul acestora.

§ 1508. — In acest scop se întrebuințează tehnicile obișnuite de histologie și care au fost menționate la capitolele respective.

TEHNICI HISTOLOGICE PENTRU EXPERTIZA MEDICO-LEGALĂ A PĂRULUI

§ 1509. — Expertiza părului în medicina legală constitue un foarte important procedeu de identificare, după cum servește și la stabilirea [illegible] individ ce avea barba rasă.

Tehnica examenului [illegible] părți: prelevarea, curățirea, decolorarea, deshidratarea și montarea.

§ 1510. — *Prelevarea* se face cu ajutorul unei pense [illegible] fine, care permite de cele mai multe ori să se smulgă părul în întregime, cu bulbul său. Prelevarea se poate face pe om viu, cadavru, animale vii sau moarte, sau chiar împăiate.

Expertiza medico-legală interesează în mod deosebit firele de păr corp delict care se găsesc la locul crimei sau al faptului. Prelevarea părului la locul unde s'a săvârșit delictul se face cu aceleași precauții și după aceleași reguli pe care le-am studiat la tehnica expertizei petelor.

In eventualitatea unui examen comparativ, expertul trebue să preleveze păr din diferitele regiuni ale corpului victimei sau făptașului dovedit sau numai suspectat.

Odată prelevat, se va avea toată grija pentru a evita până la examenul microscopic orice fel de alterație sub raportul integrității, al formei și al culorii.

§ 1511. — *Curățirea părului.* Dacă părul recoltat provine dela un animal, acesta se va curăța mai întâi de paraziți sau de diferitele resturi de murdărie care pot să-l acopere. Părul este spălat cu eter sau cu o soluție nitrică sau de carbonat de sodiu. După aceasta se clătește bine în apă, pentru a înlătura urmele acide care pot ataca substanțele componente ale firului.

Părul astfel preparat este secționat în trei părți: vârful, trunchiul și rădăcina cu bulbul.

§ 1512. — *Decolorarea.* Părul unor anumite animale este atât de încărcat de pigment încât nu se mai pot distinge la microscop detaliile de structură. De aici se impune necesitatea de a decolora firele de păr în cursul expertizei. In acest scop se întrebuințează: acidul azotic, apa oxigenată sau apa bromată.

a) Dacă părul este de culoare foarte închisă, se introduce într'un tub plin pe trei sferturi cu acid azotic. Firele de păr se scot din timp în timp, pentru a le examina la microscop. Durata decolorării prin această metodă variază cu grosimea părului și abundența pigmentului. Ea durează însă în medie 10—30 de minute.

b) Apa oxigenată dă cele mai bune rezultate, cu condiția de a întrebuința o soluție concentrată. Se poate întrebuința și o soluție de perhidrol de 40 de volume. In genere, însă, variațiile de concentrații ale soluțiilor întrebuințate se situează dela 12—30 de volume. Durata decolorării cu apă oxigenată durează dela jumătate de oră la mai multe ore. Chiar în soluțiile cu concentrații mari nu se poate întâmpla niciun fel de inconvenient dacă firul de păr a stat în soluție mai multe ore. După decolorare, firele de păr se spală cu cantități mari de apă, pentru a îndepărta excesul de acid azotic, apă oxigenată sau bromată.

§ 1513. — *Deshidratarea*. Dacă părul este proaspăt, după decolorare se lasă câteva minute în alcool absolut.

§ 1514. — *Montarea*. Toate operațiile anterioare fiind terminate, se procedează la montarea părului, fie în apă, fie în balsam de Canada, mai mult încă, se pot întrebuința, chiar succesiv, aceste două metode. Procedeul este necesar mai ales atunci când este vorba de studiul unui aceluiaș păr. Pe o lamă se întind foarte bine câteva picături de gelatină. Se dispun cele 3 fragmente ale firelor de păr în linii paralele, se pun la etuvă până la uscare; se adaugă o picătură de apă sau de balsam și se acoperă cu o lamelă.

Un studiu minuțios histologic al părului se face prin includere la celoidină.

§ 1515. — **Procedeul Dérobert și Hausser.** *Tehnica* : 1) scufundarea pentru 30 de minute într'o soluție de carbonat de sodiu 15%; 2) spălare rapidă în apă distilată; 3) se ține 2—3 ore în apă oxigenată 40 vol.; 4) se tratează 5 minute cu acid osmic 2%; 5) colorare cu anilină-oranj 30% + bicromat de potasiu 3%; 6) deshidratare cu alcool și xilen, balsam.

§ 1516. — Un alt procedeu este următorul: *Tehnica* : 1) părul este pus în soluție caldă de carbonat de sodiu 15%; 2) spălare timp de 3 ore în apă a părului puțin pigmentat și timp de 5 ore a celui mult pigmentat; 3) colorare timp de 5 minute în acid osmic 10%; 4) colorare cu eozină și eritrozină; 5) fără deshidratare, părul este inclus în balsam de Canada.

Aceste metode de colorație au avantajul că fac mai vizibile celulele din cuticula părului. Pentru studii mai complecte ale părului se fac și secțiuni transversale, se includ mănunchiuri de păr la parafină, după care se fac secțiuni la microtomul de parafină.

METODE MICROCHIMICE PENTRU PETELE DE SÂNGE

§ 1517. — In acest grup intră metodele microcristalografice, care reprezintă singurele reacții specifice și de certitudine pentru a dovedi origina sanguină a petelor. Principiul acestor metode constă în formarea de cristale pe cale fizico-chimică.

Punerea în evidență a cristalelor Teichmann

§ 1518. — Cristalele Teichmann sunt cristale de clorhidrat de hematină. Procedeul *Teichmann* are două variante: una lentă și alta rapidă.

§ 1519. — *Procedeul lent*. Reactivii necesari sunt: apa distilată sau soluția salină fiziologică și acidul acetic glacial. Se macerează pata suspectă într'o sticlă de ceasornic cu apă distilată, nu însă în exces. Timpul necesar macerației este variabil. Se va căuta în orice caz ca produsul de macerație să fie cât mai colorat posibil. Cu o pipetă Pasteur se ia o picătură din lichidul de macerație și se pune pe lamă. Se evaporează încet prin plimbarea lamei deasupra unei flăcări sau se pune lama pe o platină încălzitoare. Temperatura nu trebue să depășească niciodată 60°, pentrucă peste această temperatură se coagulează albuminele. După ce prima picătură s'a evaporat, pe reziduul acesteia se lasă să cadă o altă picătură cu care se repetă aceeași manoperă de evaporare. Manopera se repetă cu atâtea picături, până ce se formează un reziduu gros, compact și destul de important cantitativ.

Pe această pată de reziduu, chiar în centrul ei, se pune o picătură de acid acetic glacial cristalizabil. Se încălzește deasupra unei flăcări preparatul, însă nu în centru, ci mai mult la periferie. Când picătura de acid acetic glacial se evaporează, fără a se ajunge însă la fierbere, se adaugă o nouă picătură și această operație se repetă de 8—9 ori. Preparatul se acoperă apoi cu o lamelă.

§ 1520. — *Procedeul rapid*. Se macerează pata suspectă și suportul său, direct pe lamă. Se izolează o picătură foarte colorată, prin exprimarea suportului cu ajutorul a două ace de sticlă. Se evaporează la flacără fără a depăși 60°. Când evaporarea este complectă, se acoperă reziduul cu o lamelă și se introduce prin capilaritate pe una din laturi, între lamă și lamelă, o picătură de acid acetic glacial. Se evaporează preparatul foarte încet, deasupra unei flăcări până la fierbere, fără să se ajungă însă la evaporarea totală. Când acidul acetic este în fierbere, se adaugă prin capilaritate o nouă picătură de acid acetic și manopera se repetă de 2—3 ori. După a treia fierbere, se adaugă o ultimă picătură de acid acetic glacial, care nu se mai încălzește, pentrucă cristalele de clorhidrat de hematină sunt solubile la cald în acidul acetic.

§ 1521. — Examenul microscopic pune în evidență cristalele lui Teichmann de clorhidrat de hematină, care sunt foarte numeroase mai ales la periferia preparatului. Cristalele au forma de prisme alungite de 1—20 μ, unori fiind reunite în stele de forme foarte diferite. Sunt colorate în brun-clar, sau sunt translucide. Frecvent, sunt rombice sau romboedrice. Cristalele Teichmann sunt anizotrope în lumina polarizată și dau loc la fenomenul de pleiocromie.

Cu sângele foarte alterat, reacția este negativă. Ea are desavantajul de a nu da rezultate cu valoare absolută, uneori pretând la erori.

faptul că anumite săruri de brom şi iod dau cristale halogene de hematină cu o pată de sânge. Prin această metodă se obţin cu IH cristalele lui Stryzowski de iodhidrat de hematină. Soluţiile întrebuinţate se prepară în felul următor: I. Alcool, apă, acid acetic glacial āā 1 cc, acid iodhidric incolor 2 picături. Se va amesteca cu multă îngrijire. Soluţia nu se poate păstra mai mult de 24 de ore. II. Soluţia Oustinoff înlătură inconvenientul alterării după 24 de ore. Aceasta se prepară din: acid acetic glacial 1 cc, gumă arabică 25% 1 cc, acid iodhidric 1% 3—5 picături.

Tehnica : pe o lamă uscată se pune un fragment din pata suspectă, care se acoperă cu o lamelă. Se adaugă câteva picături de reactiv şi se încălzeşte timp de 10—20 de secunde, până la fierbere. In timpul fierberii se adaugă alte câteva picături de reactivi, fie din primul, fie din al doilea. Este indiferent care din cele două soluţii se întrebuinţează. Se obţin cristalele lui Stryzowski de forma prismelor rombice, care sunt mici şi negre. Prezenţa acestor cristale de iod hidrat de hematină este un semn pozitiv al naturii sanguine a petei examinate. Avantajul acestei metode este dat de faptul că executarea ei este posibilă şi cu o pată foarte veche şi este aplicabilă chiar şi în pete foarte mici care nu depăşesc cinci miimi de miligram de sânge.

§ 1523. — Metoda G. Bertrand. Principiul este acelaş ca şi pentru metodele microchimice de mai sus.

Soluţii necesare: reactivul lui G. Bertrand care se prepară din: clorură de magneziu cristalizată 1 g, apă distilată 1 g, glicerină la 30° 5 g, acid acetic glacial 20 g.

Se disolvă mai întâi clorura de magneziu în apă, se adaugă apoi glicerina şi la urmă se adaugă acidul acetic glacial. Reactivul se evaporează mai încet.

Tehnica : se depune o picătură din reactiv fie pe reziduul unei soluţii sanguine de macerație, fie pe un fragment de pată, fie chiar direct pe o fibră din ţesutul suportului care în prealabil a fost dilacerat. Se acoperă preparatul cu o lamelă. Se încălzeşte deasupra unei flăcări fără a se ajunge la fierbere.

Cristalele lui Bertrand care se obţin sunt la fel cu crstalele lui Teichmann, deosebindu-se de acestea doar prin faptul că sunt ceva mai mici.

Avantajul metodei este că formarea acestor cristale este posibilă chiar şi cu o cantitate de o jumătate de miime de miligram de sânge şi chiar şi atunci când este vorba de un sânge foarte vechi.

Metode pentru cristalele de hemocromogen

§ 1524. — Procedeul Ustinov constă în obţinerea de cristale ale unui pigment derivat din hemoglobină şi care este hemocromogenul sau hematina alcalină redusă.

1 parte.

Tehnica : se adaugă la preparatul care conţine sânge uscat una sau două picături din reactivul de mai sus. Se acoperă cu o lamelă şi se încălzeşte deasupra flăcării, până începe fierberea. După răcire se formează mari cristale roşii-brune, clare, în formă de ace, uneori reunite în jerbe, cruci sau stele, având câteodată aspectul de tablete rombice.

§ 1525. — Un procedeu asemănător este următorul: reactivi necesari: *a)* soluţie de iod iodurat cu formula: iod 2,5 g, iodură potasiu 0,5 g, alcool de 96° 25 g; soluţie *b*: piridină 1 picătură; soluţia *c*: sulfură de amoniu 1 picătură.

Tehnica : pe o lamă de sticlă se pune o mică crustă din pata de sânge sau un fragment din suportul pătat cu sânge, peste care se pun câteva picături de piridină. Se adaugă o picătură de iod iodurat şi se evaporează preparatul la o căldură temperată. Se adaugă o picătură de piridină şi o picătură de sulfură de amoniu. Se acoperă cu o lamelă.

Cristalele de hemocromogen apar la microscop colorate în roşu foarte închis, având forme variate de tablete rombice, ace, tablete dreptunghiulare.

Avantajul metodei constă în faptul că dă rezultate şi acolo unde procedeul Teichmann s'a soldat cu un rezultat negativ. Proba este valabilă cu sânge foarte vechi, sânge care a suferit încălziri sau a fost tratat cu acizi şi alcali şi chiar cu sângele putrefiat.

Are desavantajul faţă de metoda Teichmann că este mai complexă şi necesită mai mulţi reactivi decât aceasta.

METODE FIZICE

§ 1526. — Procedeul microspectroscopic. Soluţiile necesare metodei: hidrosulfit de sodiu sau sulfură de amoniu. Sol. acid clorhidric la pH = 2. KOH 30%.

Tehnica : unele manopere diferă cu natura suportului: *a)* dacă pata este groasă, se detaşează din ea o parte şi se pune pe lamă; *b)* dacă pata are ca suport rufărie sau haine, se va detaşa o fibră din stofa impregnată cu substanţa care este bănuită a fi de sânge; *c)* dacă suportul este opac, se va folosi metoda amprentelor. Se va căuta pigmentul pe amprenta depusă pe hârtia sugătoare.

1. Fie că este vorba de o particulă de pată, de fibre sau amprente, acestea se pun pe lamă; 2) se acoperă aceste elemente cu o picătură de hidroxid de potasiu 30%, se acoperă preparatul cu o lamelă şi se examinează la microscop. Pata este lăsată timp de 30 de minute în prezenţa hidroxidului de potasiu; 3) se caută partea cea mai densă a preparatului cu ajutorul obiectivului mic şi apoi se introduce prin capila-

ritate, cu ajutorul unei pipete Pasteur, între lamă şi lamelă, o picătură de sulfură de amoniu; 4) se examinează preparatul cu un obiectiv mai puternic şi se pune la punct în regiunea cea mai densă a preparatului; 5) fără a atinge sistemul optic micrometric, se înlocueşte ocularul obişnuit prin microspectroscop.

Dacă pata este de sânge, apare un spectru cu două benzi de absorbţie. O bandă este la stânga foarte intensă, întunecată şi netă între *D* şi *E*, şi o bandă la dreapta, mai puţin întunecată şi subţire, situată dincolo de *E*.

Acesta este spectrul hemocromogenului, după care putem să afirmăm cu certitudine că pata este de sânge.

Unii autori recomandă să se dizolve petele în acid clorhidric la pH = 2.

Această tehnică, care pune în evidenţă spectrul hemocromogenului, este riguros specifică pentru sânge şi are avantajul de a nu fi susceptibilă de nicio eroare.

§ 1527. — **Procedeul spectrofotometrici în lumina ultravioletă** utilizează fotografierea în ultraviolet a spectrului protoporfirinei. *Tehnica*: se detaşează pata suspectă de pe stofă şi se tratează cu câteva picături de acid acetic (maximum 1,5 cc). Se adaugă X picături de clorură stanoasă 35% în apă, la care s'a adăugat 25% acid clorhidric. Se încălzeşte până la fierbere. Dacă pata conţine sânge, ea virează dela brun la verzui. Se retrage dela fierbere şi se adaugă 0,50 g acetat de sodiu cristalizat. Soluţia trece dela verde la roz. Expusă la razele ultraviolete, ea capătă o frumoasă fluorescenţă roz-portocalie.

Spectrofotometria în lumina ultravioletă permite să se deceleze urme de sânge de 3,5 dintr'o miime de miligram de sânge.

Microspectroscopia se aplică atunci când pata de sânge, fiind extrem de mică, nu permite diagnosticul naturii ei prin celelalte metode.

METODE MICROCHIMICE PENTRU DIAGNOSTICUL PETELOR DE SPERMĂ

Procedee microcristalografice

§ 1528. — **Procedeul Florence** pune în evidenţă cristale de periodură de colină sau cristalele lui Florence. Reactivul se prepară în felul următor: periodură de potasiu 1,56 g, iod metaloidic 2,54 g, apă distilată 30 cc. Se disolvă mai întâi periodura de potasiu numai în cantitatea de apă absolut necesară, se adaugă apoi iodul în prealabil spălat. In sfârşit, se adaugă apa distilată până la complectarea volumului de 34,1 g. Apa se adaugă numai în momentul când pe fundul eprubetei se remarcă formarea unei masse cleioase omogene.

Reactivul trebue preparat extemporaneu şi înainte de întrebuinţare trebue lăsat să se răcească, doarece reacţia se produce extrem de greu când reactivul este încă cald.

Tehnica: o porţiune din pata suspectă izolată sau cu suportul ei se pune pe o lamă şi se lasă să macereze în apă distilată, care se adaugă picătură cu picătură. Când suprafaţa suportului este intens imbibată sau capătă un aspect gelatinos, produsul de macerare se rade de pe suport şi este transportat pe o altă lamă. La lichidul de macerare se adaugă câteva picături din reactiv, se acoperă cu o lamelă şi se examinează la microscop.

La microscop, cristalele lui Florence au o coloraţie brună, având o formă de paralelogram şi sunt de dimensiuni extrem de variabile. Cristalele apar şi în pete foarte vechi şi chiar în sperma diluată 1 la 400.

§ 1529. — **Procedeul Barberio** constă în obţinerea cristalelor de picrat de spermină.

Reactivul este o soluţie apoasă saturată de acid picric.

Tehnica: pata se prepară utilizând aceleaşi manopere ca şi pentru procedeul anterior, utilizând soluţia saturată de acid picric.

Când pata este de spermă, examenul microscopic arată cristale galbene, de dimensiuni variabile, cu diferite forme geometrice. Metodele microspectroscopice sunt negative, cu sperma putrefiată şi au mai mult o valoare de orientare, putând preta la erori.

Cristalele lui Barberio sunt considerate astăzi ca un compus al acidului picric cu fosfatul de spermină. Reacţia are însă o sensibilitate mult mai mică decât procedeul lui Florence.

§ 1530. — **Procedeul Bokarius.** Principiul este acelaş ca mai sus. Acest autor recomandă două soluţii, care pot fi întrebuinţate independent. Soluţia I: soluţie apoasă saturată de acid picric 25 cc, iodat de cadmiu 3 g, gumă arabică 2 g; soluţia II: acid acetic glacial, apă distilată (părţi egale); acid picronitric până la saturaţie.

Tehnica: la fel ca la procedeul anterior, numai că reactivul este înlocuit cu una din cele două soluţii de mai sus. Examenul microscopic arată cristale mai mari.

Acestea sunt metodele microchimice cele mai importante pentru diagnosticul petelor de spermă.

Dintre acestea, cel mai sensibil, cel mai simplu şi cu orientarea cea mai netă este procedeul microcristalografic al lui Florence.

Toate rămân însă numai metode de orientare, niciunul din procedee neputând da certitudinea.

§ 1531. — **Metode spectrografice pentru diagnosticul petelor de spermă.** Pata de spermă este examinată la spectrograf direct pe suportul său, în lumina ultravioletă care traversează pata.

Sperma prezintă o fluorescenţă care începe către 4 000 Å. Maximum este obţinut către 4 200 Å, apoi fluorescenţa descreşte către 4 959 Å, unde se termină.

In aceste condiții, fluorescența care se obține este superpoziția celei a suportului și celei a spermei. Prima este de o importanță mimină și este cuprinsă între violet și albastru. Fluorescența spermei ne arată însă o bandă largă care se întinde dela violet la verde-albastru și care merge dela 4000 la 5000 Å.

Aspectul spectrului spermei este neschimbător și varietatea suportului, ca și vechimea petelor, dimpotrivă, accentuează mai mult fluorescența.

METODE PENTRU EXAMENUL PETELOR DE MECONIU

§ 1532. — **Procedeu microscopic.** *Tehnica* : 1) pata suspectă se pune la macerat în apă distilată, fie direct cu suportul său, fie în fragmente detașate; 2) după o jumătate de oră, meconiul se umflă și se poate ușor separa și racla de pe suport cu ajutorul unui ac; 3) produsul de macerație separat se întinde între lamă și lamelă. La microscop se cercetează diferitele elemente constitutive ale meconiului.

§ 1533. — **Procedeul histochimic** cercetează colesterolul din meconiu. 1) Preparatul obișnuit de meconiu se colorează fără fixare cu o picătură de Lugol și o picătură de acid sulfuric; 2) se acoperă cu o lamelă. Cristalele de colesterol se colorează în violet.

Avantajul examenului microscopic al petelor de meconiu este că permite identificarea meconiului și de a determina bineînțeles aproximativ vârsta fătului.

§ 1534. — **Metode fizice.** In lumina ultravioletă, pata de meconiu prezintă o fluorescență brună.

METODE APLICATE LA OASE IN MEDICINA LEGALĂ

§ 1535. — Singurele tehnici care pot să conchidă la origina umană sau animală a unui os sunt cele microscopice. Aceste tehnici sunt aplicabile la toate aspectele oaselor; oase proaspete, oase vechi, macerate, putrefiate sau carbonizate.

§ 1536. — **Procedeul măsurării diametrului mijlociu al canalelor Havers.** *Tehnica* : se detașează cu ajutorul unei foarfeci fine o mică rondelă din osul de examinat. Detașarea se face transversal. Secțiunea trebue să aibă un milimetru grosime. Se netezește una din fețele secțiunii cu hârtie de sticlă sau cu o piatră de ascuțit, până ce această suprafață devine netedă. Se pudrează piatra cu oxid feric, după care se continuă șlefuirea secțiunii osoase, până ce aceasta capătă o culoare roșie. Se spală cu apă curentă secțiunea și piatra.

Se continuă apoi polizarea până ce secțiunea capătă o culoare roz-palid. Se lasă să se usuce și secțiunea se fixează apoi pe o lamă cu balsam de Canada.

Examenul se face la un microscop obișnuit, la care atașăm însă un ocular micrometric și luminare oblică.

Secțiunea apare roz-palid, iar canalele lui Havers umplute cu oxid feric sunt foarte bine vizibile. Se măsoară cu ocularul micrometric 100—200 dintre ele și se face media. Se poate spune că osul expertizat este uman, atunci când diametrul canalelor Havers depășește 25 μ.

Tabela de diluţii pentru alcool

	95°	90°	85°	80°	75°	70°	65°	60°	55°	50°	45°	40°	35°
90°	6,41												
85°	13,33	6,56											
80°	20,95	13,79	6,83										
75°	29,52	21,89	14,48	7,20									
70°	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64								
65°	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15							
60°	63,00	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76						
55°	77,99	67,87	57,90	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47					
50°	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	10,35				
45°	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	22,90	11,41			
40°	144,46	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55	11,7		
35°	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	58,31	43,59	27,6	14,4	
30°	224,08	206,22	188,57	171,1	153,61	136,04	118,94	101,71	84,54	67,45	50,6	33,4	17,8

Pentru a obţine un alcool de o concentraţie = x, se caută aceasta în scara verticală, se urmăreşte orizontala până în dreptul alcoolului din care se face diluţia, şi se adaugă la 100 cc din acest alcool, cantitatea de apă indicată la întâlnirea celor două ordonate.

INDEX ALFABETIC

A

Acetalfosfatide 850
Acetat de uranil 197
Acetona 196
Acid acetic 198
— azotic 199
— carminic 151
— cromic 200
— fosfowolframic 201
— osmic 227
— picric 202, 645
— platinclorhidric 203
— ribonucleic 848
— sulfasalicilic 204
— timonucleic 847
— tricloracetic 205
Albastru de anilină 646
— — metilen 634
— — Nil 722, 725
— — metilen Löffler 1287
— — toluidină 633
— tripan 148
— policrom 1290
— Turnbull 757
Alcool etilic 206, 207
— formolat 263
— metilic 203
Amestec dioxanmelitic 276
— dioxancupric 277
— picrodioxanic 275
Amiloid 927
Aparat Golgi 696
Argintina 845
Arsenul 807
Ascuţirea cuţitelor 461
Azan 903
Azur de metilen 635
Aurantia 647
Aurul 808, 810

B

Bacterii în ţesuturi 1278—1342
— albastru Löffler 1287
— — policrom 1290
— bacilul leprei 1312—1315
— bacilul Koch 1304—1311
— bacilul tific şi paratific 1300
— bacilul rinoscleromului 1297
— fuxină fenolată 1289
— gonococ 1302
— metoda Gram 1292
— morva 1298—1299
— şancrela 1301
— spirochete 1316—1326
— tionină fenicată 1294
— virusuri 1327—1342
Bateria de deshidratare 332
Benzopurpurina 648
Bicromat de potasiu 209
Bismutul 811

C

Calciul 812
— mascat 817
— solubil 816
Carmin aluminat 610
— boracic 605
— cromalaun 609
— Grenacher 611
— litinat 146, 608
— Mayer 612
— metilic 607
Carotinoid 765
Cartilaj 931—937
Celoidina includere 404
— tehnica 414—433
— turnarea blocurilor 415
Celula cromafină 1023

Celula osoasă 945
Centrozom 711
Ciuperci în țesuturi 1343—1348
Clasificare 317, 330
Cloroform 210
Coloranții 492—499
— electronegativi 137
— electropozitivi 154
— vitali 142
Colorarea 474—491
— reticulocitelor 872
— vitală a sângelui 165
Colorația Papanicolau 668
— Șmeliov-Volfson 173
— vitală 134
Colorații citoplasmatice 643
— nucleare 589
Condensator 15, 58
Condriom 160, 669
— colorare 690
— colorație vitală 160
— fixatori 673—680
Congelarea 281
Conjunctiv 891
Conjunctiva 1221
Cornee 1224
Coroidă 230
Corp ciliar 1230
Corpi eritrocitari 878
Corpul microscopului 4
Cremaliera microscopului 6
Crezazan 1019
Cristalin 1221
Cromoacetoosmic 249
Cromozomi 704
Cromotrop 2 R 650
Culturi de țesuturi 1354—1459
— colorarea preparatelor 1407—23
— colorația vitală 1405
— examinarea culturilor 1396
— extract embrionar 1373
— fixarea preparatelor 1405
Culturi masa de lucru 1381
— material necesar 1357
— medii de cultură 1360
— pe medii lichide 1424
— plasma 1361
— punerea culturilor 1382
— soluții saline 1369
— tehnici speciale 1424
— culturi epiteliale 1434
— fagocitoză 1448
— histogeneză 1458
— leucopoeză 1443
— osteogeneză 1446
— protozoare 1450
— tumori 1435
— virusuri 1455
— trecerea culturilor 1387
— trefone 1371
Cupru 818
Cuțite de microtom 452
— ascuțirea 461

D

Decalcificare 941
Deparafinarea secțiunilor 399
Derivații fenolici 851
— dermului 1261
Deshidratarea 317
Diazoreacția 843
Digestia cu pepsină 894
— — tripsină 895
— pe secțiune 898
Dinții 958
Dopioxidazele 771

E

Elastic 921
Eleidină 1257
Eozina 651
Epiderm 1250
Epifiza 1036
Eritrozina 653
Eter absolut 408, 409
Examenul cu contrast de faze 66
— în camera umedă 128
— pe fond negru 51
— ultramicroscopic 64

F

Fenolazele 766
Fermenții 767
Fermenții oxidazici labili 770
Fibrele pituicitelor 1021
Fibre reticulinice 910, 914, 918
Fibrina 890
Ficatul 1006
— canaliculi biliari 1007, 1008
evidențierea bilei 1006 *a*
Fier în țesuturi 757, 821—827
Filtrele 13
Fixarea 174
— durata 186
— in situ 187
— oprire 192
— recoltarea pieselor 188
— spălare în alcool 194
— — în apă 193
Fixatori 195
— acetona 196
— acetat de uranil 197
— acid acetic 198
— — azotic 199
— — cromic 200
— — fosfowolframic 201
— — picric 202
— — platinclorhidric 203
— — sulfosalicilic 204
— — tricloracetic 205
— alcool etilic 206
— — metilic 208
— Allen 247
— amestecuri 233
— anhidri 274—280
— bicromat de potasiu 209
— Bouin 234
— Carnoy 248
— Ceasovnicov 257
— Champy 253
— Ciaccio 266
— cloroform 210
— Dubosq-Brazil 236
— Flemming 249
— formol 211
— fotografici 598
— Helly 243
— Lang 262
— Maximov 244
— Nichiforov 245
— Petrunchievici 272
— Podvâsoțchi 256
— Regaud 255
— Romeis 241
— Roschin 254
— sublimat 222
— subțiri 239
— Susa 238
— Șabadaș 658
— Tellyesniczky 250
— tetraoxid de osmiu 237
— Țupa 258
— Vasintocichin 240
Floxina 658
Formol 211
Fosfataze 791
— acide 792
— alcaline 794
— în os 944
Fosfor 828
Frotiul de sânge 860
Fuxina acidă 657
Fuxina fenolată 1219

G

Galben metanil 659
Glande salivare 989
Glande suprarenale 1022
— celule cromafine 1023
Glichemalaun 618
Glicogenul 739
— colorare Arndt 750
— — Best 748
— — Langhans 747
— fixare 740—745
Glutationul 844
Grăsimile 719—738
— neutre 719
— — colorare cu clorofilă 731
— — — acid osmic 726
— — — Sudan III și Scharlach 724

H

Hemalaun acid 616
— Mayer 615
Hematoidină 759
Hematoxilină 614
— Delafield 629
— Dobell 626
— cozină 654
— fosfotungstică 900
— Heidenhain 619
— Loyez 628
— Papanicolau 630
— Regaud 625
— Weigert 627
Hemosiderina 756
Hemozoina 760
Hipoderm 1261
Hipofiza 1016
Histochimia 800

I

Impregnări metalice 500
Incinerarea 802
Includerea în celoidină 404
— tehnica 404
— — rapidă 433
— celoidin-parafină 449
— colodiu 439
— gelatină 441
— în parafină 305
Indoreacția 851 *A*
Insule Langerhans 1032—1034

Intestin 1001
— celulele mucoase 1001
— — Paneth 1002
— glandele Brunner 1003
— plăcile Peyer 1004
— plexurile nervoase 1004
Iris 1230
Izvoarele de lumină 48

K

eratina 1259
Keratohialin 1255
Kernechtrot 636

L

Lampa cu arc 52
Lichidul Allen 247
— Aoyama 260
— Bouin 234
— Bouin-Hollande 237
— Carnoy 248
— Ceasovnicov 257
— Champy 253
— Ciaccio 266
— Dubosq-Brazil 236
— Flemming 249
— Helly 243
— Lang 262
— Maximov 244
— Nichiforov 245
— Petrunchievici 272
— Podvâsoţchi 256
— Rabl 271
— Regaud 255
— Romeis 241
— Roschin 254
— Subtri 239
— Susa 238
— Tellyesniczky 250
— Ţupa 258
— Vasintocichin 240
— Zenker 242
Lipirea secţiunilor de parafină 389
Lipofuscina 763

M

Macroglia 1140—1146
Mastocite tisulare 888
Medicina legală 1460—1536
— celule vaginale în spermă 1506
— cristale Barberio 1529
— — Florence 1528
— — hemocromogen 1524
— — Teichmann 1518
— decolorarea părului 1512
— microspectroscopie 1526
— oase 1535
— origina petelor de sânge 1479
— păr 1509
— pete de colostru şi lapte 1507
— pete de meconiu 1532
— pete de spermă 1492—1505
— recoltare 1464
— recoltarea petelor 1468—1471
— sânge menstrual 1480
— spectrofotometrie 1527
— tehnici pentru sânge 1472
Melanina 762
Mercurul 834
Metacromazia 483
Metoda Achuccaro (fibre de reticulină) 918
— Altmann (condriom) 692
— Alzheimer (condriom) 1119
— Andrews (condriom) 710
— Aoyama (condriom) 702
— Benda (nevroglie) 1132
— Benda-Spielmeyer (mielină) 1127
— Best (glicogen) 748
— Bethe (neurofibrile) 1086
— Boeke (terminaţii nervoase) 1184
— Bielschowsky (neurofibrile) 1107—1111
— Bielschowsky-Gros-Schulze (terminaţii nervoase) 1187
— Cajal (aparat reticular) 1113
— Colacev Nasonov (condriom) 699 şi (sistem nervos) 1115
— Ciaccio 733
— Culcitchi (mielină) 1124
— Crezazan (hipofiză) 1019
— Da'Fano (condriom) 703
— Doghel (terminaţii nervoase) 1197
— Dubreuil (condriom) 695
— Fischer (glicogen) 732
— Golgi 1066
— Golgi-Tisutchin 1071
— — Culcitchi 1072
— Golodeţ 738
— Gömöri (fibre de reticulină) 910
— Holzer (gliofibrile) 1137
— Hornowski (elastic) 925
— Hortega (celule pineale) 1037
— Jivago-Peşcovschi, Saposnicov 713
— Lavrentiev (terminaţii nervoase) 1188
— Lentz (viroze) 1349
Metoda Levaditi (spirochete) 1319
— Lison (peroxidoze) 785
— Lorrain-Smith-Dietrich 735
— Mann (viroze) 1342
— Mann Kopsch 700
— Manuelian (spirochete) 1317—1318
— Marchi (mielină degenerată) 1129
— Minchin 666
— Morozov (viroze) 1335
— Nicolau (viroze) 1336
— Nicolau-Kopciowska (viroze) 1337
— Niculescu-Hornet (glie) 1153
— Nissl 1075
— Noguchi (spirochete) 1323
— panoptică 869
— Pasini (piele) 1249
— Paschen 1333
— pentru canalicule biliare 1007-1008
— pentru celula nervoasă 1064
— pentru celule argentafine 1009
— pentru granulele celulelor secretoare salivare 1000
— picro-indigo-carmin 663
— Rahmanov (terminaţii nervoase) 1193
— Ramon y Cajal (neurofibrile) 1101
— Romanovschi-Giemsa 865
— Schmidtmann (muşchi striaţi) 971
— Schultz 737
— Schultze (terminaţii nervoase) 1187 şi 1189
— Slonimschi-Lapinschi (peroxidaze) 786
— Snesarev (nevroglie) 1138
— Taniguki (viroze) 1334
— Troiţchi (terminaţii nervoase) 1190
— Turchini (acizi nucleici) 849
— Weigert (mielină) 1121
— — (nevroglie) 1131
— Wilder (fibre de reticulină) 914
— Ziehl-Neelsen (b. Koch în ţesuturi) 1304
Metode de includere 296—451
— rapide de deshidratare 342
— reconstrucţie 534—556
Microfotografie 557—597
Microglie 1149—1153
Micromanipulator 103
Microscopul 1
Microscopul cu lumină polarizată 74
— de câmp 42
— — fluorescenţă 72
— electronic 111
Microspectroscopie 98
Microtomul de celoidină 436
— de ghiaţă 288
— de parafină 384
Mielină 1120
— nervi 1164
Miocard 976
Montarea secţiunilor colorate 504
— în balsam 513
— în glicerină 511
Mordansarea 488
Mucicarmin 667
Muşchi netezi 972
Muşchi striaţi 965

N

Naftarazina 641
Naftol reacţia pentru oxidaze 778
Negru clorazol E 152
Negru de fum coloidal 145
Neurofibrile 1085
Neurofibrile (în nervi) 1171
Nevroglie 1085

O

Obiectivele microcopului 25
Ocularele microscopului 16
— indicatoare 30
Oglinda microscopului 12
Oligodendrolgie 1147, 1148
Oranj G 660
Orceină 912
Organe hematopoetice 854, 884
Organul auzului 1239—42
— mirosului 1215—19
— vederii 1220—38
— — cataracta 1232
— — conjunctiva 1221
— — cornee 1224
— — coroidă 1230
— — corpi ciliari 1230
— cristalin 1231
— — gerontoxon 1229
— — retină 1234
Os 938
— fosil 954
Ovar 1039
Oxidoreductaze 788

P

Pancreas 1030
— ergastoplasma 1035
— insule Langerhans 1032—34

Paracarmin 613
Parafina preparare 308
Parafinarea 358
Paratiroide 1028
Părul 1269
Paraziți în țesuturi 1349—53
Peroxidaze 773, 873
Picătura groasă 883
Piciorul microscopului 3
Picroformolul acetic 234
Picrofuxina 901
Picroindigocarmin 663
Pielea 1243
— derm 1261
— eleidină 1257
— epiderm 1250
— hipoderm 1261
— keratina 1250
— keratohialin 1255
— metoda Pasini 1249
— părul 1269
— terminații nervoase 1275
— unghia 1269
Pigmenți 754
Pigmentul malaric 760
Plămân 985
Plasmal 850
Plasmocite 882
Plasmodiul malariei (în țesuturi) 1352
Platina microscopului 7
Plumb 835
Ponceau 661
Potasiu 836
Prepararea alcoolului 319
— — absolut 320
— eterului 408
— soluțiilor de celoidină 406
Preparatul proaspăt 122
— deshidratare 133
— fixare 129
— lipire 127
— tratament final 149
Principiul lui Köhler 578
Proba acetonei anhidre 343
alcoolului absolut 324
— eterului absolut 409
Purificarea alcoolului 353
— benzenului 356

R

Reacția Feulgen 847
— Millon 839
— mielonadioxidazică 769
— naftolperoxidazică 779
— ninhidrinei 840
— Perls 758
— plasmală 850
— xantoproteică 838
Reactiv Schiff 847 *a*
Recoltarea pieselor 188
Recuperarea toluenului 357
Recuperarea alcoolului 354
Reticulocite 872
Retina 1234
Revelatori fotografici 593—597
Revolverul microscopului 9
Rezorcină-fuxină Weigert 923
Rinichiul 1009—1013
Roșu Congo (amiloid) 930
Roșu Congo 649
Roșu diamin rapid 153
Roșu de tiazină 902

S

Safranina 637
Sânge 854
Scara cromatică de interferență 83
Scharlach R 720
Siderocite 881
Sirop Apathy 508
— Kassarinof 510
Sistem nervos 1044—1214
— — aparat reticular intern Golgi 1112
— — — metoda Cajal 1113
— — — metoda Colacev-Nasonov 1115
— — celula nervoasă 1064
— — — metoda Golgi 1066
— — — — Golgi-Tisutchin 1071
— — — — Golgi-Culcițchi 1072
— — — — Nissl 1075
— — — — tigroida 1074
— — condriom 1117
— — — metoda Alzheimer 1119
— — disociere 1060
— — evidențierea contrastului de culoare 1079
— — fixarea 1048
— — includere în gelatină 1057
— — mielina 1120
— — — metoda Benda-Spielmayer 1127
Culcițchi 1124
— — metoda Marchi 1129
— — — — Weigert 1121
— — — neurofibrile 1085
— — — metoda Bethe 1086
— — — Bielschowsky 1107—1111
— — — impregnații metalice 1088
Sistem nervos neurofibrile metoda Ramon y Cajal 1101
— — — nevroglia 1131
— — metoda Benda 1132
— — meoda Weigert 1131
— — astrocite 1140
— — gliofibrile Holzer 1137
— — metoda Snesarev 1138
— — oligodendroglie 1147—1148
— — microglie 1149—1153
— trofospongiul Holmgren 1126
Sistem nervos periferic 1154
— — examen proaspăt 1154
— — mielină 1164
— — neurofibrile 1171
— — terminații nervoase 1175—1214
Sistemul optic al microscopului 10
Soluția May-Grünwald 870
Soluții saline fiziologice 124
Spirochete în țesuturi 1316—1326
Stativul microscopului 2
Stomac 991
— canalicule intracelulare din celulele secundare 998
— celule argentafine 999
— celule mucoase 994—995
Sublimatul 222
— îndepărtare 226
— acetic 262
Subtri 239
Succinhidraza 790
Substanța cromotropă 853
Sudan III 721
Susa 238

T

Tăierea la ghiață 290
Tehnica cu benzidină-safranină 776
Tehnica argentică Macinschi (oase) 956
Terminații nervoase 1175
— coloratia postvitală 1199
— în piele 1275
— impregnare cu clorură de aur 1175
— impregnări argentice 1178
— — metoda Bielschowsky 1183
— — metoda Boeke 1184
— — metoda Cajal 1179—1180
— metoda Bielschowsky-Gros-Schultze 1187
— — metoda Deinee 1181
— — metoda Lavrentiev 1188
— — metoda Schultze 1189
— — metoda Rahmanov 1193
— — metoda Troițchi 1190
— metoda Doghel cu albastru de metilen 1197
metoda cu acid formic 1177
— metoda cu zeamă de lămâie 1176
Testiculul 1040
Tetraoxidul de osmiu 227
Tigroida 1074
Timusul 1038
Tionina 631
— fenolată (bacterii) 1294
Tiroida 1025
— celule 1026
— coloid 1027
Tirozina 772
Trahom 1222—1223
Trahee 982
Trefone 1371
Tricrom Masson 905
Trofospongiul Holmgren 1116
Tubul microscopic 8
Turnarea blocurilor de celoidină 415
Turnarea blocurilor de parafină. 367

U

Unghia 1269
Uree 846

V

Vase 888
Verde de metil 639
— — pironină 640
Verde lumină 662
Violet de gențiană (bacterii în țesuturi) 1288
Violet de metil (amiloid) 929
Virusuri 1327—42
Vitamina A 796
Vitamina C 797—798

TABLA DE MATERII

Cuvânt înainte ... 3

PARTEA GENERALĂ

Microscopul de prof. dr. *A. Teitel* ... 5

Preparatul proaspăt de dr. *G. Hiescu* ... 30

Colorațiile vitale, supravitale și postvitale ... 32

Fixarea și fixatorii de dr. *Al. Eskenasy* ... 42

Substanțele fixatoare ... 48

Amestecurile fixatoare ... 55

Congelarea și secționarea la ghiață de dr. *P. Nicolescu* ... 62

Metodele de includere-microtoame de dr. *P. Nicolescu* ... 65

Includerea în parafină ... 67

Includerea în celoidină ... 88

Includerea în gelatină ... 97

Includerea în celoidină-parafină ... 98

Cuțitele de microtom ... 99

Colorarea și coloranții de dr. *Al. Eskenasy* ... 104

Coloranții ... 108

Impregnările metalice ... 110

Montarea secției colorate de dr. *P. Nicolescu* ... 110

Metodele de reconstrucție de prof. dr. *E. Repciuc* ... 116

Microfotografia de prof. dr. *E. Repciuc* ... 125

PARTEA SPECIALĂ

Colorațiile nucleare de dr. *P. Nicolescu* ... 135

Citologia de dr. *G. Hiescu* ... 147

Metodele de colorare a citoplasmei ... 147

Condrionul ... 151

Aparatul Golgi ... 156

Cromozomii ... 158

Centrozomul ... 161

Grăsimile, glicogenul, pigmenții de conf. dr. *Aug. Mureșanu* ... 163

Fermenții și vitaminele de conf. dr. *A. Hagi-Paraschiv* ... 172

Histochimia de conf. dr. *A. Hagi-Paraschiv* ... 184

Cercetarea substanțelor anorganice ... 184

Reacții histochimice pentru combinații organice ... 195
Sângele și organele hematopoetice de dr. *Al. Eskenasy* ... 205
Țesutul conjunctiv de dr. *A. Eskenasy* ... 211
Cartilajul de prof. dr. *E. Repciuc* ... 221
Osul de prof. dr. *E. Repciuc* ... 222
Dinții de prof. dr. *E. Repciuc* ... 227
Țesutul muscular de conf. dr. *Aug. Mureșanu* ... 228
Parenchimele de dr. *G. Iliescu* ... 230
Aparatul respirator ... 230
Tubul digestiv și glandele anexe ... 231
Glandele cu secreție internă ... 235
Sistemul nervos de conf. dr. *A. Hagi-Paraschiv* ... 242
Tehnici pentru sistemul nervos central ... 248
Tehnici pentru sistemul nervos periferic și terminații nervoase ... 284
Organele de simț de conf. dr. *A. Hagi-Paraschiv* ... 305
Organul mirosului ... 305
Organul vederii ... 306
Organul auzului ... 311
Pielea și formațiunile anexe de conf. dr. *A. Hagi-Paraschiv* ... 313
Metode de cercetare microbiologică a țesuturilor de dr. *Gh. Diaconiță* 321
Culturi de țesuturi de dr. *Valentina Roșca* ... 344
Tehnici citologice și histologice aplicate în medicina legală de dr. *Gh. Diaconiță* ... 375
Anexe ... 396
Index alfabetic ... 397
Tabla de materii ... 405

