

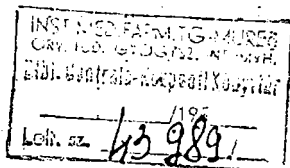
CERCETĂRI ASUPRA METODELOR
DE COLORARE MACROSCOPICĂ
A CREERULUI

TEZĂ

pentru doctorat în medicină și chirurgie
prezentată și susținută în ziua de 1934

de

FLORICA POP



Cluj

23 MAY 2005

UNIVERSITATEA DIN CLUJ
FACULTATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

Decan : D-nul Prof. Dr. GH. MARTINESCU

Profesori:

Clinica stomatologică	Prof. Dr. <i>Aleman I.</i>
Istoria medicinei	" " <i>Bologa V.</i>
Bacteriologie	" " <i>Baroni V.</i>
Patologia generală și experimentală	" " <i>Botez A. M.</i>
Clinica oto-rino-laringologică	" " <i>Buzoianu</i>
Istologia și embriologia umană	Prof. Dr. <i>Drăgoiu I.</i>
Clinica infantilă	" " <i>Gane T.</i>
" ginecologică și obstetricală	" " <i>Grigoriu Cr.</i>
Semiologie medicală	" " <i>Gola I.</i>
Clinica medicală	" " <i>Hațieganu I.</i>
Clinica chirurgicală }	" " <i>Pop A.</i>
Medicina operatoare }	
Medicina legală	" " <i>Kernbach M.</i>
Farmacologia și farmacognozia	" " <i>Martinescu Gh.</i>
Clinica oftalmologică	" " <i>Michail D.</i>
" neurologică	" " <i>Minea I.</i>
Igienă și igienă socială	" " <i>Moldovan I.</i>
Radiologia medicală	" " <i>Negru D.</i>
Anatomia descriptivă și topografică	" " <i>Papilian V.</i>
Fiziologia umană	" " <i>Popovici Gh.</i>
Balneologie	" " <i>Sturza M.</i>
Clinica dermato-venerică	" " <i>Tătaru C.</i>
" urologică	" " <i>Țeposu E.</i>
Chimia biologică	" " <i>Thomas P.</i>
Clinica psihiatrică	" " <i>Urechia C.</i>
Anatomia patologică	" " <i>Vasiliu T.</i>

JURIUL DE PROMOTIUNE :

Președinte: D-nul Prof. Dr. *V. Papilian*

Membri: { D-l Prof. Dr. *I. Drăgoiu*
" " " *T. Vasiltu*
" " " *V. Bologa*
" " " *Gh. Popoviciu*

Supleant Dl Doc. Dr. *Velluda*

Înainte de a dezvolta obiectul tezei mele pentru obținerea titlului de doctor în medicină, mă simt îndemnată atât de un sentiment al datoriei, cât mai ales de o spontană pornire sufletească să-mi amintesc la prima pagină de cei ce au contribuit la înfăptuirea lucrării prezente.

În primul rând mulțumesc Dlui Prof. *Victor Papilian* pentru că a binevoit să-mi încredințeze problema *metodelor de colorare macroscopică a creierului* spre a o studia și pentru că mi-a pus la dispoziție cu toată amabilitatea laboratorul D-Sale, unde am putut lucra în condițiunile cele mai avantajoase.

Mulțumesc Dlui Dr. *Gabriel Rusu*, asistent, care familiarizat mai de mult cu metodele întrebunțate de mine, mi-a dat indicații tehnice și mi-a stat cu toată colegialitatea la dispoziție la obținerea și prepararea pieselor anatomice.

Mulțumesc asemenea prietenei mele Dna Dr. *Victoria Median*, asistentă la Institutul de Chimie, pentru că mi-a întins mână de ajutor în rezolvirea chestiunilor de chimie, ivite în cursul lucrării de față.

Nu pot termina această pagină fără să-mi exprim toată gratitudinea D-lor Profesori I. Scriban, D. Călugăreanu dela Facultatea de Științe și I. Drăgoiu dela Facultatea de Medicină. În timpul cât am avut ocazia să lucrez ca preparatoare sau asistentă în laboratoarele conduse de domniile lor, am putut însuși nu numai multe metode de lucru, ci și dragostea pentru cercetarea științifică.



Cercetări asupra metodelor de colorare macroscopică a creerului

I. ISTORIC.

Pentru a produce un contrast de culoare între substanța cenușie și cea albă a creerului în secțiuni macroscopice, s'au încercat încă de mult anumite metode. Acestea se bazau mai cu seamă pe colorarea nucleilor celulari cu diferiți coloranți, ca borax-carminul, carminatul de natriu etc. Rezultatele au fost însă puțin satisfăcătoare, întrucât pentru a reuși, colorația trebuia să fie făcută cu multă precizie. Fiindcă supra-colorările erau greu de evitat, iar odată produse nu mai puteau fi înlăturate, rezultatele bune depindeau mai mult de întâmplare.

Metoda cea mai bună care accentua contrastul dintre cele două substanțe ale creerului rămăsese cea cu albastrul de Berlin: substanța cenușie se colorează în albastră închis, iar substanța albă nu se colorează deloc, sau cel mult devine de un albastru foarte palid.

Guizzetti, în 1915 colorează macroscopic felii din creer proaspăt de om cu ferocianură de potasiu și cu sulfură de amoniu, pentru a pune în evidență fierul fiziologic din acel organ. Autorul așează felii de creer nefixat întâi într'o soluție de ferocianură de potasiu 2%, le ține aci 1—1½ ore, apoi înlocuiește soluția aceasta cu una de acid clorhidric 2%. Feliile rămân în soluția de acid clorhidric 24 ore, în care timp apare o culoare albastră intensivă în anumite centre cerebrale. Culoarea e datorită albastrului de Berlin, produs din acțiunea ferocianurei de potasiu asupra fierului fiziologic din creer. Patru centre din acest organ se colorează mai intensiv: locus niger al lui Soemmering, nucleul roșu al lui Stilling globul palid și nucleul dințat al cerebelului. Deasemenea ob-

ține o colorare puternică a acestor centre cu sulfura de amoniu în concentrație de 30%.

Înainte de Guizzetti colorări asemănătoare a făcut *Zaleski* în 1886. Acesta însă nu dă date mai precise asupra localizării reacției fierului în feliile de creier.

Guizzetti și-a extins cercetările și asupra creierilor animalelor domestice, găsind în general aceleași relațiuni ca la om. A cercetat și creierii de copii și feți, constatând că aici reacția de colorare a fierului e foarte slabă sau lipsește cu totul. Cercetările acestui autor au fost reluate mai târziu de *Spatz* care a obținut rezultate foarte interesante pe care le vom trata în cursul lucrării de față.

II. CONSIDERAȚIUNI ASUPRA PROCEDEELOR DE COLORARE MOCROSCOPICĂ A CREERULUI

Dintre metodele mai vechi de colorare a creierului, cel mai mare interes îl prezintă metoda *albastrului de Berlin*. Importanța acestui procedeu a relevat-o *Sincke* într'un articol destul de recent publicat în *Anatomischer Anzeiger* din 1926. Autorul descrie aici tehnica amănunțită a metodei și discută cauzele care determină, pe lângă aceleași condițiuni de colorare și cu aceiași reactivi, o colorație intensivă a scoarței cerebrale și o lipsă de colorare a substanței albe. Procedeu este următorul: Se fixează secțiunile groase din creier în formalină de concentrația 10%, după care se spală în apă distilată și apoi se imbibă cu o soluție de clorură ferică 1% timp de 4—12 ore, după grosimea feliei. Secțiunile astfel pregătite se spală din nou și se țin în soluție apoasă de ferocianură de potasiu (1%), până în momentul când se formează un precipitat albastru: ferocianura ferică sau albastrul de Berlin. Acesta producându-se numai în regiunea substanței cenușii, o colorează pe aceasta selectiv, dând astfel un contrast foarte evident între ea și substanța albă. În data ce s'a produs colorația, secțiunile se scot din soluție și se spală cu multă grijă. Se pot păstra în formol 10%.

Sincke este de părerea că intensiva colorare a materiei cenușii prin metoda albastrului de Berlin este datorită unei afinități speciale a ei față de sarea ferică întrebuițată. Ace-

astă afinitate lipsește substanței albe, iar substanța cenușie o manifestă numai pentru fier nu și pentru alte metale. Autorul încearcă să dovedească aceasta prin faptul, că întrebuițând săruri metalice (alte decât cele a fierului), cari dau cu anumiți reactivi precipitate colorate (cum ar fi sulfatul de nichel și sulfura de amoniu, sulfatul de cobalt și sulfura de amoniu, nitratul de plumb și cromatul de potasiu, sulfatul de cupru și hidratul de amoniu) nu se produce o colorare selectivă a substanței cenușii, ci o colorare uniformă a ambelor substanțe din creier. Numai în cazul sărurilor de nichel a obținut o colorație ceva mai intensivă a materiei cenușii, pe care o explică prin înrudirea chimică dintre acest metal și fier.

Sincke se întreabă dacă nu cumva afinitatea substanței cenușii față de fier este determinată de fierul existent în mod fiziologic în creier. N'a putut însă răspunde documentat acestei întrebări.

Autorul admite că contrastul dintre culoarea albastră închisă a scoarței celebrale și cea foarte palidă a substanței albe se bazează în mare parte și pe deosebirea de constituție fizico-chimică a celor două substanțe din creier. Lipoidele substanței albe ar împiedeca fixarea soluțiilor întrebuițate în colorare. Intr'adevăr dacă se extrage mielina fibrelor nervoase din o secțiune de creier printr'un amestec de benzol cu eter sau alcool cu eter și apoi se tratează aceeași secțiune cu soluțiile de clorură ferică și ferocianură de potasiu, se produce o colorație intensă, difuză, care prinde ambele substanțe ale creierului, ba uneori substanța albă se colorează mai intensiv decât cea cenușie.

Și glia prin alcalinitatea ei ar contribui la intensificarea colorării scoarței: din reacțiunea dintre clorura ferică și substanțele alcaline ale gliei s'ar produce hidratul de fier care cu ferocianura de potasiu dă albastrul de Berlin.

Un alt fapt care contribuie, după Sincke, într'o oarecare măsură la colorarea selectivă a scoarței, este prezența aci într'un număr mai mare a capilarelor. Autorul nu dă însă nici o explicație în privința rolului ce l-ar avea aceste vase de sânge în producerea colorării.

Mainland în lucrarea sa „Über makroskopische Färbung von Gehirnpräparaten mit Berlinerblau” publicată în *Anatomischer Anzeiger* din 1928 se ocupă amănunțit cu rezultatele

obținute de Sincke asupra creerului prin metoda albastrului de Berlin. El vede cauza deosebirii de colorație a celor două substanțe din acest organ în textura lor diferită: substanța cenușie are o textură mai neregulată și mai grosolană, cea albă mai regulată și mai fină.

Dacă se rade o bucată de substanță albă cu hârtie de frecat sau cu o perie, ea devine mai neregulată și se colorează intens cu albastrul de Berlin. Dacă radem și substanța cenușie pe o oarecare întindere, în acel loc ea se colorează mai intensiv.

Mainland — ca și Sincke de altfel — a obținut reacțiunea tipică a albastrului de Berlin pe felii de creier fixat în formol. Lucrând cu material proaspăt nefixat, observă că reacțiunea de colorare în regiunea cenușie a secțiunilor e mai slabă și precipitatul produs se poate ușor îndepărta. În feliile de creier fixat chiar și numai timp foarte scurt, precipitatul produs e mai bine reținut de scoarță.

Preparatele bine fixate în formol se colorează selectiv, repede și intensiv chiar dacă înainte de colorare au fost spălate.

Din cercelările de mai sus autorul trage concluzia că formolul produce o modificare în structura fizică a substanțelor cerebrale. Acesta nu ia parte la reacțiunea chimică dintre reactivi, întrucât precipitatul colorat se produce tot atât de prompt și după îndepărtarea formolului din țesături.

Mulligan (2) a întrebuițat pentru evidențierea substanței cenușii acidul tanic și o sare de fier. Contrastul de culoare, foarte pronunțat pe secțiunea de creier este datorit producerii unei pelicule protectoare formată la suprafața materiei albe din lipoizii disolvați ai mielinei.

Blair, Davies și Mc Clelland (5) ne putându-și explica afinitatea specială a substanței cenușii pentru fier, în cazul colorării selective cu albastrul de Berlin, încearcă pentru colorarea microscopică a secțiunilor de creier diferite săruri metalice, altele decât cele ferice, cum făcuse și Sincke. Rezultatele obținute au fost publicate într'un articol din *Journal of Anatomy* din 1932.

Autorii au reușit să obțină contraste de culori foarte evidente procedând după metoda albastrului de Berlin. Ei cred că insuccesul lui Sincke se datorește imbibării prea îndelun-

gate a secțiunilor de creier în diferitele soluții de reactivi. Pentru reacția albastrului de Berlin Sincke recomandă (ținerea preparatelor în soluția de clorură ferică timp de câteva ore, ori se poate obține un contrast de culori foarte pronunțat și după un timp mai scurt. În reacțiile de colorare făcute de *Blair*, *Davies* și *Mc Clelland* au fost suficiente câteva minute pentru a obține rezultate pozitive. E drept însă că Sincke prin metoda imbibării îndelungate a obținut colorări permanente cari durau patru ani, pe când colorările autorilor englezi sunt de o durată scurtă.

Acești autori s'au folosit de secțiuni groase de creier fixate în formalină și de mai mulți reactivi, dintre cari sunt menționați numai aceia cari au lăsat materia albă a creierului necolorată sau foarte palid colorată, iar substanța cenușie au scos-o în evidență printr'o culoare intensivă. Reactivii sunt perechi, adică dubli; feliile de creier se țin câțva timp în reactivul dintâi apoi se spală și se așează în reactivul al doilea.

Iată substanțele întrebuițate și precipitatele colorate obținute prin reacția dintre ele:

I. 1) Sulfură de sodiu și 2) nitratul de cobalt. Precipitatul: Sulfura de cobalt, colorează substanța cenușie într'un sur negru.

II. 1) Sulfura de sodiu și 2) nitratul de plumb. Precipitatul: Sulfura de plumb, colorează scoarța în brun închis.

III. 1) Tartratul de stibil și 2) hidrogenul sulfurat. Precipitatul: Sulfura de antimoniu, colorează substanța cenușie în galben-portocaliu.

IV. 1) Nitratul de plumb și 2) Iodura de potasiu. Precipitatul: Iodura de plumb colorează materia cenușie într'un galben canar.

Amănunte asupra tehnicii colorărilor voi da la sfârșitul lucrării.

Toate precipitatele rezultate din combinarea chimică a perechilor de reactivi amintiți, colorează selectiv substanța cenușie. Rezultatele pozitive date de aceste reacțiuni răstoarnă deci ipoteza afinității specifice a substanței cenușii față de fier, ipoteză, prin care Sincke interpretează colorarea selectivă a scoarței cerebrale cu albastrul de Berlin.

Din rezultatele descrise reiese, că substanța cenușie arc

afinitate și pentru celelalte câteva metale din soluțiile întrebuințate și ce e mai interesant, ea nu se colorează numai cu precipitate metalice, ci și cu substanțe care nu conțin metale. Astfel autorii s'au folosit de amidon și iod; rezultatul colorării a fost pozitiv. Pentru a obține reacția se întrebuințează o soluție de amidon și o soluție foarte diluată de iod în iodură de potasiu. Substanța cenușie se colorează în violetul închis caracteristic reacției amidonului cu iod, în timp ce materia albă ia o culoare galbenă palidă.

Reacțiunile de colorare selectivă datorită reactivilor atât de feluriți, par a exclude prezența unei combinațiuni chimice între substanța cenușie sau un element al ei (de ex. fierul) și între reactivi. O dovadă avem în faptul că prezența fierului fiziologic în scoarță nu provoacă aci o colorare mai intensivă cu albastrul de Berlin, decât cu alte precipitate cari nu conțin fier. Dacă și substanțe din materia cenușie (fierul) ar lua parte la reacție, intensitatea acesteia în cazul albastrului de Berlin ar trebui să fie mult mai mare, întrucât fierului din clorura ferică i-s'ar adăuga și cel din țesutul nervos.

Deci nu se poate da o explicație pe bază chimică colorării selective a substanței cenușie. În această colorare, după autorii englezi Blair, Davies și Mc. Clelland, intervin fenomene fizice ca puterea de penetrare a reactivilor și diferita lor adsorbție în cele două substanțe ale creierului.

Fără îndoială că precipitatul colorat este rezultatul unei combinațiuni chimice dintre reactivii perechi întrebuințați: el se formează și în eprubetă, însă producerea lui exclusiv sau în mare parte în regiunea substanței cenușii nu se poate explica pe cale chimică.

Când o felie de creier e imbibată cu soluția reactivului dintâi, are loc o penetrație a soluției și o adsorbție a sărurilor diferite atât ca suprafață cât și ca adâncime în substanța albă și cea cenușie. În substanța cenușie penetrarea e mai adâncă și adsorbția mai mare ca în cea albă. O spălare rapidă îndepărtează deci inegal reactivul din cele două materii: mai mult din cea albă și mai puțin din cea cenușie. Cu reactivul al doilea se produce precipitatul colorat care se formează în cantitate mai mare în substanța cenușie colorându-o astfel intensiv. Substanța albă a cărei putere de adsorbție față de reactivul întâi e mai mică, se colorează foarte slab sau de loc. Pre-

cipitatul format în regiunea substanței cenușii este reținut de aceasta tot prin adsorbție.

Spălând mult timp secțiunea din creier după imbibarea cu primul reactiv, nu se mai produce reacția de colorare cu reactivul al doilea, fiindcă primul a fost complet îndepărtat. Între reactivi și substanța cerebrală nu avusese deci loc nici o combinație chimică, ci numai o adsorbție care a permis îndepărtarea reactivului prin spălare.

Dacă înainte de colorare radem sau frecăm cu o perie sau cu hârtie de frecat o parte de substanță albă din secțiunea de creier, partea rasă se colorează cu aceeași intensitate, ca substanța cenușie, deoarece prin radere i-se mărește puterea de adsorbție.

Afară de factorii fizici amintiți, are un rol important în producerea colorării selective și constituția, deosebită din punct de vedere fizic și chimic, a celor două substanțe cerebrale. Se poate spune chiar că penetrarea reactivilor și adsorbția lor în creier sunt determinate în mare parte de această constituție.

Totuși, o explicație bazată numai pe acțiunea factorilor fizici nu este suficientă în unele cazuri de colorare selectivă a substanței cenușii. Spatz (1) în articolul său publicat în *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* din 1922 expune metodele și rezultatele unei serii întregi de cercetări făcute asupra secțiunilor de creier, în legătură cu prezența fiziologică a fierului în acest organ. Autorul se folosește pentru cercetările sale de material proaspăt, de material fixat în formol și de material fixat în alcool, reușind să pună în evidență fierul prin următoarele metode:

1. *Metoda cu sulfura de amoniu* (după Quincke); ținând o felie dintr'un creier proaspăt într'o soluție concentrată de sulfură de amoniu, în câteva minute globul palid și locus niger al lui Soemering se colorează intens într'o culoare foarte închisă, aproape neagră, contrastând puternic cu suprafața secțiunii din jur. Prin acțiunea prelungită a soluției se colorează și alte regiuni ale creierului, deosebindu-se însă de primele două printr'o intensitate mai mică. Se observă o serie de gradațiuni între intensitatea culorii globului palid și a locus niger-ului și între regiunile cari nu se colorează de loc

ca de ex. substanța cenușie din măduva spinării. Metoda este simplă, rapidă și sigură.

După Spatz culoarea este datorită precipitatului de sulfură de fier negru, rezultat din reacțiunea fierului din centrele nervoase și sulfura de amoniu. Globul palid și locus niger se colorează mai repede și mai intensiv fiindcă sunt mai bogate în fier.

2. *Metoda cu albastrul de Turnbull* (după Tirmann și Schmelzer). Sulfura de fier produsă prin acțiunea sulfurei de amoniu asupra creierului, se preface în prezența acidului clorhidric diluat și după adaus de fericianură de potasiu într'un compus albastru stabil: albastrul de Turnbull. Metoda e potrivită mai ales pentru preparate microscopice. Tabloul obținut pe secțiune, îndeosebi după o colorație ulterioară a nucleilor cu alaun carminic este plin de contraste între centrele cerebrale bogate în fier și cele sărace sau lipsite de acest element.

3. *Metoda albastrului de Berlin (Perl)* bazată pe reacția dintre fierul din țesutul nervos și ferocianura de potasiu. În prezența acidului clorhidric diluat, se produce un precipitat complex: Albastrul de Berlin. Amănunte asupra tehnicii acestor metode voi da la sfârșitul lucrării.

Prin toate procedeele menționate se obțin contraste între aceleași părți cenușii ale creierului intens colorate și substanța din jurul lor rămasă necolorată. Reacțiunea se poate observa și microscopic pe bucăți de creier proaspăt ținute $\frac{1}{2}$ oră într'o soluție de sulfură de amoniu și apoi destrămate pe o lamă cu un bastonaș de sticlă. Apar granule de o culoare foarte evidentă.

Foarte apropiat de aspectul secțiunilor din creier proaspăt colorate după metodele de mai sus, este acela oferit de feliile de creier fixat timp scurt (12—24 ore) în formol 10%. Lăsând însă să acționeze formolul timp mai îndelungat (1 lună de ex.) o parte din fierul țesutului nervos se disolvă și difuzează la suprafața secțiunii și în lichidul fixator, unde se poate pune în evidență. Reacția de colorare nu mai este limitată la cele câteva centre mai bogate în fier ci este difuză.

Prin fixarea în alcool de 96% fierul nu se disolvă și reacția de colorare mărginită la anumite centre, se obține și pe un material ținut timp de mai mulți ani în acest fixator.

Totuși alcoolul produce anumite transformări. Pe secțiunile de creier nefixat tratate cu sulfură de amoniu fibrele cu mielină din centrele intens colorate apar albe, nemodificate de acțiunea reactivului. Când preparatul a fost ținut mai mult timp în alcool, tocmai aceste fibre se colorează mai puternic. Fenomenul este și mai frapant când fixarea s'a făcut într'un amestec de alcool și eter. Faptul acesta s'ar explica prin dizolvarea învelișului lipoidic al fibrelor nervoase și prin punerea în libertate a fierului lipoidic, probabil acesta dă reacția de colorare cu sulfura de amoniu. Dar distribuția specială a culorii în centrele amintite, când toată secțiunea a fost tratată cu alcool și eter nu este explicată.

Alcoolul mai acționează asupra substanței cerebrale în sensul că mărește penetrabilitatea ei pentru reactivi, reacția de colorare producându-se astfel mai repede.

Cu toate că aspectul secțiunilor fixate în alcool și apoi colorate este deosebit de cel al secțiunilor de creier proaspăt tratate cu acelaș colorant, materialul păstrat în alcool se poate întrebuința foarte bine, întrucât deosebirea este întotdeauna aceeași; se vorbește de un „aspect echivalent” al secțiunilor fixate în alcool. Faptul prezintă importanță pentru cazul când din diferite motive materialul (Creerul) nu poate fi examinat proaspăt.

Rezultate interesante s'au obținut prin îndepărtarea fierului din creier cu acizi și imbibarea secțiunilor cu o soluție de clorură ferică. Făcându-se apoi asupra acestor secțiuni reacția cu sulfură de amoniu sau cu alt reactiv care dă un precipitat feric colorat, aspectul secțiunii a fost cu totul deosebit de cel rezultat din reacția fierului existent în mod natural în creier. S'a produs colorarea intensivă a întregii substanțe cenușii și o colorare foarte palidă a substanței albe — deci s'au obținut rezultate asemănătoare cu ale lui Sincke, Blair, Davies și Mc. Clelland, cari s'au folosit de reactivi dubli.

Spatz a întrebuințat pentru cercetările sale 116 creiere dela indivizi morți între 16—72 ani de boli infecțioase, acute și cronice, tumori și tulburări nervoase și psihice. Autopsia s'a făcut după o oră dela moarte pentru a se împiedeca autoliza creierului și astfel dizolvirea fierului și difuziunea lui în tot organul.

Diferențele constante de intensitatea de culoare, dintre

anumite centre nervoase din creier și altele din jurul lor, obținute pe un material atât de bogat și variat, au permis autorului să grupeze toate centrele nervoase cenușii în 4 grupuri deosebite.

1. *Centrele grupului întâi.* Se colorează verde cenușiu câteva minute după așezarea secțiunilor de creier proaspăt în soluția de sulfură de amoniu. Aceste centre sunt globul palid și locus niger. După scurt timp sunt foarte intense colorate și se deosebesc prin aceasta foarte net de toate celelalte centre din jurul lor. Rapiditatea colorației merge paralel cu intensitatea ei. În timpul acesta și centrele grupului al 2-lea se evidențiază printr-o culoare cenușie-verde.

Intrebuințând soluția de ferocianură de potasiu și de acid clorhidric 1%, culoarea albastră apare ceva mai târziu, însă tot în ordinea de mai sus: adică după 2—3 minute de la acțiunea reactivului, apar colorate albastru globul palid și locus niger mai cu seamă în partea lui numită zona reticulată; după 5 minute apar centrele grupului al 2-lea. Pe lângă rapiditatea și intensitatea cu care se colorează cele două centre, ele se mai caracterizează și prin constanța reacțiunilor de colorare.

2. *Centrele grupului al 2-lea.* Se observă puțin timp după colorarea celor din grupul întâi. Colorarea lor se accentuează mereu fără a atinge însă, chiar după o baie de mai multe ore în reactiv, gradul de colorare al globului palid și al locus niger-ului. Centrele grupului al 2-lea sunt: nucleul roșu, nucleul dințat al cerebelului, corpul subtalamic al lui Luys și striatul (putamen și nucleul caudat).

Ele vin în urma celor din grupul întâi nu numai prin intensitatea mai redusă a colorației lor, dar și prin inconstanța cu care reacționează față de reactivii coloranți. Astfel uneori deosebirea între centrele grupului 2 și 3 nu se poate face bine. Apoi suprafața colorată a unui centru nu are întotdeauna aceeași întindere și diferitele centre ale acestui grup nu sunt colorate cu aceeași intensitate.

3. *Centrele grupului al 3-lea.* Se deosebesc de cele ale grupului precedent printr-o reacție de colorare mai slabă. Variațiile în privința intensității colorației și lipsa de omogenitate în interiorul diferitelor centre sunt și mai frecvente ca în grupul al 2-lea.

În grupul al 3-lea Spatz distinge două subdiviziuni. Cen-

trele primei subdiviziuni se colorează destul de repede după grupa a doua, se deosebesc însă de aceasta prin intensitatea mai redusă a culorii. Aci aparțin: corpii mamilari, ganglionii habenulari, nucleul anterior al talamusului. In celelalte centre ale acestei subdiviziuni reacția de colorare este întâmplătoare și foarte variată. Acestei categorii îi aparține și scoarța creierului mare; intensitatea de colorație e mai mare în părțile ei inferioare care sunt în apropierea imediată a substanței albe. In diferitele regiuni ale scoarței nu se observă vre-o diferență de colorație. Numai cornul lui Ammon la bătrâni sau în unele stări patologice este mai intens colorat. Scoarța creierului mic reacționează ceva mai slab, decât a creierului mare; substanța cenușie din tuberculii quadrigemeni se colorează mai intensiv.

Subdiviziunea a 2-a din grupul al treilea cuprinde centre cari reacționează în medie cam la $\frac{1}{2}$ —1 oră dela începutul acțiunii reactivilor. Aci aparțin nucleii punții, substanța cenușie a ventriculului al 3-lea, epifiza și hipofiza, nucleii de acoperiș ai creierului mic. Aceste centre nu se colorează întotdeauna sau se pot colora numai unele din ele. După acțiunea mai îndelungată a sulfurii de amoniu sau a altui reactiv, chiar și substanța albă se colorează.

4. *Centrele grupului al 4-lea* nu dau nici o reacție evidentă. Culoarea obținută după o acțiune foarte îndelungată a reactivului nu e datorită fierului, ci însuși reactivului. Dar faptul că aceste centre nu dau nici o reacție de colorare cu reactivii întrebuiși nu înseamnă că ele nu au fier. Acesta s'ar putea găsi sub o formă care nu dă un precipitat colorat cu sulfura de amoniu sau altă substanță. Aci aparține olivă bulbară, locus coeruleus din calota protuberanțială, corpii genunchiați, ganglionii spinali și substanța cenușie a măduvei spinării.

Spatz caută deci să demonstreze, că reacțiunile de colorare obținute pe secțiuni macroscopice de țesut proaspăt cu sulfura de amoniu sau cu ferocianura de potasiu sunt datorite prezenței naturale a fierului în centrele cari se colorează. După autor acesta este un fapt netăgăduit și pentru a-l demonstra și mai evident, arată că în cenușa centrelor grupului 1 analiza chimică descopere o cantitate mai mare de fier decât în celelalte centre. (Analize făcute de Dr. Wuth).

Spatz nu neagă importanța factorilor fizici în producerea în general a reacțiilor de colorare în creier. Se întreabă chiar dacă nu s'ar putea ca deosebirile de intensitate, obținute prin metodele întrebunțate de el, să fie cauzate de penetrarea și adsorbția diferită a reactivilor în deosebitele regiuni ale acestui organ. Într'un asemenea caz prezența fierului ar putea fi numai simulată prin o colorare mai intensivă a acelor regiuni.

Spatz crede însă că în cazul reacțiilor bazate pe prezența naturală a fierului în creier, factorii fizici nu joacă decât un rol prea puțin important. Faptul, că centre cu aceeași structură nu dau o reacție de colorare de o egală intensitate, iar centre cu structură diferită dau o reacție asemănătoare, este o dovadă că fierul reprezintă factorul principal căruia i-se datorește reacția. Apoi s'a văzut că fixarea de scurtă durată în formol nu produce nici o modificare în distribuția fierului, fiindcă acesta nu s'a dizolvat. În schimb o fixare îndelungată îl scoate din centrele unde este în cantitate mai mare făcându-l să se răspândească uniform pe întreaga suprafață a secțiunii; se obține astfel o colorație difuză a întregii substanțe cenușii și a celei albe.

Curios este însă faptul că o spălare prelungită (1—2 săptămâni) a secțiunilor ce fuseseră fixate mai mult timp în formol, nu micșorează intensitatea colorației difuze după adăusul sulfurei de amoniu. Fierul dizolvat prin formol nu e îndepărtat de apă și intră în reacțiune cu sulfură de amoniu. Probabil se formează o combinație organică a fierului cu țesutul nervos.

Spatz își extinde cercetările ca și Guizetti și asupra creierelor de animale domestice, de copii și de feți întrebunțând metoda cu sulfură de amoniu. Ajunge la următoarele concluzii: La mamifere reacția e mai slabă ca la om. La unele reacția e negativă (șoareci), la altele nucleul roșu nu se colorează (mămuțe). La copii reacția fierului fiziologic este din ce în ce mai slabă dela pubertate până la naștere; primul centru în care se produce colorația la jumătate de an dela naștere este globul palid; urmează locus niger și mai târziu celelalte centre. Ordinea de apariție a reacțiunilor în cursul dezvoltării corespunde cu ordinea de intensitate a lor la adult. La feți, reacția a rămas complet negativă, chiar după o acțiune de mai multe zile a reactivului.

Colorarea selectivă a scoarței cerebrale după metodele cu reactivi dubli, contribuie la cunoașterea structurii fizice a celor două feluri de substanțe din creier. Adsorbția și permeabilitatea diferită a lor față de reactivi dovedesc deosebirea mare dintre ele din acest punct de vedere.

Rezultatele obținute prin metodele de colorare macroscopică întrebuintate de Spatz pentru punerea în evidență a fierului fiziologic din creier, ne sugerează, și ele, o serie de probleme dintre cele mai interesante.

Importanța cercetărilor lui Spatz este multiplă. În primul rând s'a dat posibilitatea de a diferenția rapid, simplu și sigur anumite centre nervoase; până acum pentru a le deosebi, trebuia să ne folosim de metodele histologiei fine, cari ne arătau numai deosebirile structurale.

Din punct de vedere al distribuției topografice a centrelor nervoase, metodele cu sulfură de amoniu și albastru de Berlin, ne arată că anumite centre îndepărtate în spațiu, dau aceeași reacție histo-chimică, deosebindu-se prin aceasta net de altele din imediata vecinătate. În legătură cu acest fapt se pune problema, dacă reacția histo-chimică comună a anumitor centre indică și o identitate funcțională a acestora.

Reacțiile lui Spatz mai au și o importanță din punct de vedere biologic. Ele ne conduc la probleme importante, ca originea fierului fiziologic din creier, starea sa fizico-chimică și rolul ce l-ar avea acolo și în special în centrele unde se găsește în cantitate mare.

Atâtea chestiuni interesante sunt numai în parte elucidate și pentru explicarea lor s'a recurs mai mult la ipoteze. Argumentele bazate pe fapte anatomice, fiziologice sau patologice sunt încă foarte puține; totuși voiu încerca să redau câteva idei cari ating problemele amintite.

Din experiențe pe animale și din observarea anumitor cazuri clinice s'a constatat, că centrele cerebrale, cari dau o reacție intensivă a fierului, fac parte dintr'un important sistem motor, independent de cel piramidal: *sistemul extrapiramidal*. Asupra acestuia au făcut cercetări de mare valoare C. și O. Vogt și K. Wilson.

Sistemul extrapiramidal e format din nucleul dințat al cerebelului, locus niger al lui Soemering, nucleul roșu, globul palid, corpul lui Luys și striatul (nucleul caudat și puta-

menul). Aceste centre sunt legate între ele și cu măduva spinării direct prin fibre nervoase; sunt legate indirect și cu scoarța creierului mare și cea a celui mic. Rolul lor este de a controla, a modera tonusul și de a regula mișcările automate și involuntare. „*Motricitatea elementară, automată, subconștientă, funcțiune a poligonului lui Grasset, are ca centru principal corpul striat, centrele mezencefalice, cu cari aceia sunt în legătură — și căile eferente extrapiramidale*”. (L. Rimbaud).

Centrele amintite se aseamănă prin intensitatea colorației, ca structură sunt însă foarte diferite. Numai globul palid și zona reticulată a locus niger-ului au o structură asemănătoare; striatul prin numeroșii săi neuroni mici ne amintește de structura creierului mare cu care este înrudit și embriologic. Se poate spune așa dar — nu însă fără rezerve — că reacția histo-chimică comună a anumitor centre, indică o identitate funcțională.

Cercetările microscopice au adus și ele contribuțiuni însemnate la limpezirea unor probleme în legătură cu prezența fierului fiziologic în creier. Microscopic s'a găsit că reacția de colorare intensă se produce în granule cu conținut de fier, incluse în elementele anatomice ale sistemului nervos. Nu se știe sub ce formă este legat fierul în aceste granule. Ele sunt de mai multe feluri:

Unele sunt foarte fin dispersate în țesutul nervos al centrelor cari se colorează intens și dau acolo o colorație difuză.

În citoplasma celulelor de origină ectodermică a centrelor grupului 1 și în striat, formațiunile feruginoase se găsesc sub forma de granule necolorate natural. Ele sunt răspândite în întreg corpul celular printre corpusculii lui Nissl, sunt totdeauna separate, nu confluează și nu se găsesc în nucleu; nu se pot pune în evidență prin coloranții celulari obișnuiți, ci numai prin reacțiile de colorare ale fierului. Ele reprezintă deci fierul depus intravital în neuroglie și celulele mari nervoase din centrele amintite.

Fierul se mai prezintă sub forma unor granule de pigment feruginos, de culoare galben-brună, mai mari decât cele necolorate natural. Aceste granule sunt depozitate mai cu seamă în elemente mezodermice ca pachete perivascularare și sunt formate din lipofuscină și fier. Sub ce formă este legat

aci acest element, iarăși nu se știe. El se disolvă sub acțiunea acizilor rămânând liber pigmentul, care acum nu mai dă reacția de colorare a fierului.

Dintre toate aceste formațiuni, mai mare interes prezintă granulele fine necolorate. Nu se știe însă care este compusul sub care se găsește fierul în ele și peste tot cum au luat naștere aceste granule. După *J. Arnold* ele se dezvoltă din microsomii citoplasmatici preexistenți cari depozitează cele mai variate substanțe ca: grăsimi, glicogen, fier.

Tot microscopic s'a constatat că prezența granulelor cu conținut de fier este expresia vitalității celulelor nervoase și neuroglice. Granulele amintite se găsesc numai acolo unde celulele sunt nealterate sau prea puțin lezate. În cele moarte sau grav alterate, colorația secțiunilor microscopice cu albastrul de Turnbull nu le mai pune în evidență.

Cercetările microscopice au mai arătat că fierul fiziologic din creier e constant și independent de distrugerea eritrocitelor și deci de formarea hemosiderinei. El nu scade când în organism se întrebuițează cantități mai mari pentru refacerea hemoglobinei. Fierul fiziologic deci nu e de origine hematogenă, e histogen. E luat de celule probabil din lichidele țesuturilor, dar indirect tot din sânge.

Se cunosc totuși cazuri, de mărire a cantității de fier în celulele nervoase și gliale ale centrelor grupurilor I și II. E vorba de câteva cazuri patologice, în cari s'au observat simptomele unei rigidități extrapiramidale (encefalită epidemică trecută în parkinsonism). În acelaș timp s'a găsit mărită și cantitatea de pigment depusă în glia aceluiași centre, pigment care în cea mai mare parte nu dă reacția fierului.

În paralizia generală și encefalita epidemică încă găsim pigment feruginos în mare cantitate, sub formă de îngrămădiri locale în infiltratele perivascularare, caracteristice pentru aceste boli. Pigmentul e depozitat în macrofagele de origine din celulele pereților vasculari (histiocyte) și în celule fixe din acești pereți, deci în elemente mezodermice. Răspândirea lui e dependentă de procesul inflamator fără să aibă loc însă o depunere în mai mare cantitate în elementele ectodermale: celule nervoase și neuroglie.

Ar fi poate prematur să tragem concluzii asupra unui anumit proces patologic din modificările cantităților de fier

ale creerului. Intru cât merg paralel cu anumite simptome aceste modificări este foarte greu de știut, cercetările fiind încă extrem de puține.

In ori ce caz prezența granulelor feruginoase într'o cantitate mai mare, indică o particularitate în metabolismul acelor celule nervoase. E foarte greu să interpretăm prezența fierului în cazuri patologice, când abia există câteva ipoteze relativ la însemnătatea fierului fiziologic din sistemul nervos. Probabil că în cazuri patologice, activitatea celulară este diminuată, aportul de fier tisular însă rămâne același și astfel acest element se îngrămădește în celulă.

In privința rolului fierului fiziologic din creier, iată câteva ipoteze:

S'ar putea ca prezența acestui element în celulele nervoase să însemneze un indiciu pentru un metabolism încă necunoscut. Cercetările făcute în această privință n'au dus încă la rezultate concludente.

Zoologul *Robert Schneider* atrage atenția asupra fierului în legătură cu respirația și crede că fierul trebuie considerat ca un „*mișcator între celulă și oxigen, care leagă oxigenul, și-l eliberează din nou după cum se face în organism o ardere sau o reducere*”.

Hipoteza lui R. Schneider a câștigat în ultimul timp un sprijin puternic prin experiențele lui *O. Warburg* făcute asupra ouălor de Echinoderme. Acest autor găsește că fierul joacă rolul unui catalizator în respirația celulelor, permițând utilizarea oxigenului de către acestea.

Probabil că și fierul din creier joacă același rol în respirația celulară. In centrele unde el este în cantitate mai mare (centrele grupului I și II) procesele de oxidare trebuie să fie mai puternice.

Se știe că creierul este cel mai sensibil organ față de suprimarea oxigenului și este interesant, că în caz de intoxicații cu gaz de luminat sau cu oxid de carbon, partea din creier care se resimte în primul rând este aceea care dă cu cea mai mare intensitate reacția fierului: globul palid.

De sigur că toate încercările de a explica fenomene celulare atât de intime, rămân în domeniul ipotezelor. Rezultatele cercetărilor anatomice, fiziologice și patologice făcute în

acest sens sunt încă prea puține pentru ca aceste presupuneri să aibă siguranța unor constatări.

III. TEHNICA METODELOR DE COLORARE

Redau mai jos tehnica amănunțită a câtorva din metodele de colorare macroscopică a creerului, pe cari le-am refăcut după indicațiile autorilor respectivi.

I. Metode pentru colorarea selectivă a substanței cenușii.

A. *Procedeele autorilor englezi D. M. Blair, F. Davies, și G. W. Mc. Clelland.*

Din creerul fixat în formalină 10% se taie felii de o grosime de 5—10 mm.; acestea se tratează apoi cu diferiți reactivi perechi.

Reacția 1. *Precipitarea sulfurei de cobalt.*

Reactivi: Sulfura de sodiu și nitratul de cobalt.

În sulfura de sodiu (sol. 5%) preparatul se ține 3 minute.

Se spală în apă curgătoare timp de 5 minute.

În nitratul de cobalt (sol. 1%) secțiunea se ține până se observă bine diferențierea celor două substanțe ale creerului, prin contrastul de culori. Apoi secțiunea se spală la robinet și se păstrează în formalină 5%.

Reacția 2. *Precipitarea sulfurei de plumb.*

Reactivi: Sulfura de sodiu și nitratul de plumb.

În sulfura de sodiu (sol. 5%) preparatul se ține 3 minute.

Se spală în apă curgătoare timp de 5 minute.

În nitrat de plumb (sol. 1%) se ține până la diferențierea celor două substanțe ale creerului. Mai departe se procedează ca mai sus.

Reacția 3. *Precipitarea sulfurei de antimoniu.*

Reactivi: Tartratul de stibil și hidrogenul sulfurat.

În tartratul de stibil 5% secțiunea se ține 6 minute.

Se spală în apă curgătoare timp de 1 minut.

În hidrogen sulfurat, soluție saturată în apă, se ține până la distingerea netă a culorii galbene în substanța cenușie. Mai departe se procedează ca mai sus.

Reacția 4. *Precipitarea iodurei de plumb.*

Reactivi: Nitratul de plumb și iodura de potasiu.

În nitratul de plumb (sol. 1%) preparatul se ține 6 minute.

Se spală în apă curgătoare timp de 1 minut.

În iodură de potasiu (sol. 5%) se lasă până la diferențierea celor două substanțe cerebrale. Mai departe se procedează ca mai sus.

Reacția 5. *Formarea iodurei de amidon.*

Reactivi: Amidon solubil și iod.

În amidon solubil (sol. concentrată) secțiunile se țin 24 ore. Se spală în apă curgătoare timp de 3 minute.

În soluția de iod în iodură de potasiu secțiunile se lasă până apare culoarea violetă în substanța cenușie. Se pot păstra în alcool 70% la care s'a adăugat puțin iod.

Feliile de creier colorate după unele din metodele expuse, se decolorează foarte repede. Cele colorate cu sulfura de cobalt sau cu sulfura de plumb își mențin culoarea timp destul de îndelungat în formalină de 5%.

B. *Metoda lui Mainland pentru colorarea creierului cu albastrul de Berlin.*

Reactivi: clorura ferică și ferocianura de potasiu. Se taie felii de creier fixat în formol 10%, apoi se spală câteva secunde în apă curgătoare. Se îmbibă cu clorură ferică soluție 1% (căreia i-s'au adăugat câteva picături de acid clorhidric) timp de 25 secunde. Se spală în apă curgătoare, apoi se țin în ferocianură de potasiu 1% timp de 5 secunde. Se spală bine în apă curgătoare. Feliile astfel colorate se pot păstra într'o soluție de formol 4%.

În caz de supracolorare se poate ajuta prin metoda preconizată de Sincke: feliile prea intensiv colorate se țin într'o soluție diluată de amoniac până la transformarea culorii albastre a substanței cenușii într'una violetă, apoi brună. După apariția culorii brune secțiunile se spală în apă acidulată cu acid clorhidric și apare din nou culoarea albastră.

II. *Metodele de colorare macroscopică a creierului pentru evidențierea fierului fiziologic (Spatz).*

1. *Metoda cu sulfură de amoniu.*

Felii de creier proaspăt în cari sunt prezenți centrul sistemului motor extrapiramidal se țin cam o oră într'o soluție concentrată, galben deschisă, de sulfură de amoniu. Apar pe rând colorații în verde brun mai închis sau mai deschis centrul cenușii bogată în fier.

2. Metoda albastrului de Berlin.

Secțiuni de creer proaspăt cari trec prin centrul subcortical se țin în soluție de ferocianură de potasiu 2 $\frac{1}{2}$ % timp de $\frac{1}{4}$ oră, apoi se trec în soluția de 1% de acid colrhidric tot atâta timp. Centrele bogate în fier apar colorate într'un albastru de diferite intensități.

Acidul clorhidric este necesar aci pentru ionizarea fierului din țesut, ferocianura de potasiu ne putând acționa direct asupra compusului feruginos din creer.

IV. CERCETARI PERSONALE

Bazându-mă pe faptul că toate colorările selective ale substanței cenușii din creer se datoresc formării unor precipitate colorate în acea regiune, am încercat să obțin asemenea colorări întrebunțând câteva perechi de reactivi cari dau astfel de precipitate colorate.

Servindu-mă de *sulfocianat de potasiu* și de *clorură ferică* în soluții, am obținut colorarea galbenă cărămizie bine pronunțată a substanței cenușii, datorită precipitatului de sulfocianat feric. Iată procedeul:

Felii de creer fixat în formol 10% se spală foarte puțin timp în apă curgătoare, apoi se țin 3 minute într'o soluție de 5% de sulfocianat de potasiu. După acest timp se spală, clătindu-se de câteva ori în apă, apoi se lasă să stea într'o soluție de clorură ferică 1% până la apariția în scoarță a culorii galbene cărămizii. Substanța albă se colorează în galben foarte deschis.

Precipitatul produs e instabil, din care cauză preparatele se decolorează repede.

Tratând felii de creer cu soluții de *sulfat de cupru* și *hidrogen sulfurat* am obținut sulfura de cupru care colorează substanța cenușie în brun închis, aproape negru. N'am reușit însă să obțin o colorație destul de selectivă a acesteia, deoarece întotdeauna s'a colorat și substanța albă relativ intensiv.

Este aproape sigur că toate precipitatele colorate, pe lângă o concentrare potrivită a soluțiilor de reactivi și o bună dozare a timpului lor de acțiune, pot produce colorarea selec-

livă a substanței cenușii din creer. Dat fiind că intensitatea culorii depinde de însușiri fizice ale substanței cerebrale ca permeabilitatea și puterea de adsorbție față de reactivi, ea se va produce totdeauna acolo unde aceste proprietăți sunt mai pronunțate: adică în substanța cenușie.

Atât Mainland cât și Blair, Davies și Mc. Clelland au obținut cele mai frumoase colorațiuni folosindu-se de felii de creer fixat în formol.

Am încercat să colorez, după metodele lor, felii de creer proaspăt, nefixat. Am obținut colorarea selectivă a substanței cenușii, dar cu oarecari deosebiri față de cea produsă în creerele fixate.

Feliile de creer proaspăt, colorate după metoda albastrului de Berlin (Mainland) se colorează încet, incomplet, puțin intensiv și difuz, față de cele fixate. Substanța cenușie e mai intensiv colorată decât cea albă, totuși și aceasta devine de un albastru destul de pronunțat, ceea ce împiedică producerea contrastului de culoare atât de net în cazul secțiunilor de creer fixat.

Colorând felii de creer nefixat după procedeele lui Blair, Davies și Mc. Clelland, reacțiunile de colorare se produc, precipitatele formate colorează selectiv substanța cenușie, dar sunt foarte superficiale și nu sunt bine fixate de scoarța cerebrală. Substanța albă se colorează și ea, însă foarte puțin. Relații asemănătoare se observă și în cazul procedurii cu sulfocianatul feric.

Comparând rezultatele obținute prin aceleași metode asupra secțiunilor de creer proaspăt și asupra celor de creer fixat, se observă că în cazul din urmă reacțiunea se produce mai repede, precipitatul colorat este bine reținut de substanța cenușie și colorația e mai selectivă: scoarța e mai intensiv colorată, iar substanța albă nu se colorează de loc, sau foarte puțin.

Creerul fixat a câștigat deci însușiri, cari fără îndoială că sunt expresia unor modificări în structura sa fizică, determinate de acțiunea formolului. Pentru a observa mai bine influența acestui fixator asupra colorabilității substanțelor cerebrale, am fixat în el felii de creer, de grosimea unui centimetru, variindu-i concentrația și durata acțiunii. Am lucrat cu formol în soluții de 40%, 20%, 10% și 5%.

Bucățile de creer fixate timp de 15 minute în formol de 40% și colorate după metoda lui Mainland, au dat o reacție ceva mai intensivă decât cele proaspete, însă colorația a fost tot difuză. Cele fixate timp de 20 minute au dat în schimb o reacție bună, selectivă și intensivă, dar ceva mai întârziată față de timpul prescris în metoda tipică a lui Mainland. Feliile fixate în formol de 20% se colorează bine prin metoda albastrului de Berlin după o fixare de 30 minute. Reacțiunea de colorare e foarte bună, deși ceva mai lentă decât cea obișnuită. Bucățile de creer ținute în formol de 10% se colorează mai intensiv abia după vre-o 12 ore, iar cele din formol de 5% după 24 ore. Peste acest timp minim necesar fixării substanței cerebrale, secțiunile se colorează bine atât prin metoda lui Mainland cât și prin celelalte metode de colorare. Numai colorația cu sulfură de sodiu și azotatul de cobalt nu mi-a reușit la piesele fixate mai mult timp în formol de 40%.

Fixând o felie mai groasă de fier în formol de 20% timp de 30 minute și tăindu-o în jumătate după un plan paralel cu suprafețele mari, constatăm că formolul n'a pătruns încă până în grosimea feliei, ci și-a oprit acțiunea la suprafața secțiunii. Colorând felia astfel tăiată cu albastru de Berlin, obținem un aspect foarte caracteristic. *Suprafața care a stat în contact cu formolul se colorează selectiv și mai intensiv, iar cea din grosimea feliei se colorează incomplet și difuz în tocmai ca secțiunile din creer proaspăt.*

Formolul influențează deci constituția fizică a substanței cerebrale în sensul că mărește colorabilitatea substanței cenușii și o micșorează pe a celei albe. Insușirea substanței cenușii de a se colora selectiv este datorită unor factori fizici: permeabilitatea și adsorbția; presupunem prin urmare că formolul accentuează aceste proprietăți în materia cenușie și le diminuează în cea albă.

Precipitatele colorate sunt totdeauna superficiale, atât în creerul proaspăt, cât și în cel fixat. Ele sunt însă reținute de scoarță în feliile de creer fixat, pe când în cele din creer proaspăt, pe lângă că sunt și mai superficiale, adsorbția lor de către substanța cenușie e mai slabă.

V. CONSIDERAȚIUNI CRITICE ASUPRA METODELOR DE COLORARE MACROSCOPICĂ A CREERULUI

Refăcând colorările macroscopice asupra feliilor de creer am ajuns la următoarele constatări în ce privește metodele:

Metoda cea mai sigură, mai rapidă și în același timp foarte selectivă este cea cu albastrul de Berlin. Precipitatul colorant se produce la suprafața substanței cenușii atât a creerului proaspăt, cât și aceluși fixat în formol de diferite concentrații. Reacția de colorare se obține și în nucleii cenușii bulbo-protuberanțiali. Culoarea secțiunilor se păstrează nealterată multă vreme în formol de 5—10%.

Dintre metodele preconizate de Blair, Davies și Mc. Clelland cel mai puternic contrast între substanța cenușie și albă îl produce metoda cu sulfură de sodiu și azotat de cobalt. Precipitatul de sulfură de cobalt colorează aproape negru, foarte selectiv scoarța cerebrală, lăsând substanța albă complet incoloră. Culoarea preparatelor se menține, ba chiar se accentuează în formol de 10%.

Desavantajul acestui procedeu este că reacțiunea de colorare nu se produce în nucleii cenușii bulbo-protuberanțiali.

Celelalte metode bazate pe producerea unor precipitate colorante în substanța cenușie în urma reacțiunii dintre reactivii perechi, sunt de o valoare mediocră, nefiind nici atât de selective și nici atât de durabile ca primele două.

O deosebită importanță prezintă procedeul cu iodură de amidon. El dovedește în mod indiscutabil rolul preponderant al factorilor fizici în producerea colorării macroscopice a creerului.

În ce privește metodele cu sulfură de amoniu și ferocianură de potasiu pentru evidențierea fierului fiziologic din substanța cerebrală, ambele au avantaje și dezavantaje puse în evidență de Spatz.

Metoda cu sulfură de amoniu este simplă, rapidă și sigură. Sulfura de fier născută din reacțiunea fierului din creer cu reactivul, este însă un precipitat instabil care se decolorează repede în contact cu aerul. Acesta este dezavantajul metodei. — Secțiunile colorate, păstrate în alcool de 96% se decolorează mult mai încet. Spatz recomandă întrebuițarea soluției lui Hall, adică o soluție de sulfură de amoniu în al-

cool de 96%, care colorează și fixează simultan secțiunile din creier.

Metoda albastrului de Berlin este cea mai întrebuițată, însă după Spatz, de cea mai puțină încredere pentru evidențierea histo-chimică a fierului din sistemul nervos. Deși contrastul de culoare între centrele bogate și sărace în acest element este frapant și reacția se produce repede, metoda are un mare dezavantaj: se formează spontan albastrul de Berlin, când ferocianura de potasiu și acidul clorhidric acționează mai mult timp unul asupra celuilalt. Trebuie să ne ferim deci de a ține preparatele de creier mai multe ore în aceste soluții, fiindcă altfel reacția devine tot mai intensivă și vom avea o pseudo-reacție a fierului.

VI. CONCLUZII GENERALE

1. Metodele de colorare macroscopică a creierului, conduc la cunoașterea unor deosebiri între constituția fizico-chimică a substanței albe și a celei cenușii.

2. Câteva din aceste procedee se bazează pe formarea unor precipitate colorante, care colorează *selectiv și uniform* întreaga materie cenușie a creierului. Precipitatele iau naștere în substanța cerebrală prin reacțiunea chimică dintre reactivii perechi întrebuițați; colorarea selectivă a substanței cenușii se datorește însă unei deosebiri de constituție fizică a celor două substanțe. Această deosebire se manifestă printr'o mai mare permeabilitate și putere de adsorbție față de reactivii a substanței cenușii.

3. Indesebi reactivii minerali produc colorarea selectivă a scoarței. Cei organici acționează mai lent și mai puțin selectiv.

4. Cele mai bune reacțiuni de colorare le obținem asupra feliilor de creier fixat în formol.

5. În felii de creier proaspăt colorările se produc, ele sunt însă mai puțin selective, de o mai mică intensitate și mai lente (în special colorarea cu albastrul de Berlin se comportă în acest fel).

6. Formolul produce deci modificări în proprietățile fizico-chimice ale substanței cerebrale, în sensul că mărește

permeabilitatea și puterea de adsorbție a substanței cenușii și micșorează aceste proprietăți în substanța albă.

7. Prin unele metode de colorare se poate pune în evidență fierul fiziologic din creierul proaspăt. Cu ajutorul lor s'a arătat că centrele cerebrale mai bogate în fier, care dau deci o reacție de colorare mai intensivă, sunt strâns legate între ele și din punct de vedere fiziologic, făcând parte din sistemul motor extrapiramidal.

Cluj, 14 Decembrie 1934.

Văzută și bună de imprimat.

Președintele tezei,

Decan,

ss. Prof. Dr. V. Papilian.

ss. Prof. Dr. G. Martinescu.



1. Spatz H.: Über den Eisennachweis im Gehirn, besonders in Zentren des extrapiramidal motorischen Systems. Zeitschr. f. d. ges. Neur. und Psych. 1922.
2. Mulligan J. H.: Journal of Anatomy vol. 65, 1931.
3. Sincke G.: Eine neue Methode zur Färbung von makroskopischen Gehirnschnitten. Anat. Anz. 1926.
4. Mainland D.: Über makroskopische Färbung von Gehirnpräparaten mit Berlinerblau. Anat. Anz. 1928.
5. Blair D. M., Davies F., Mc. Clelland E. W.: On the nature of certain macroscopic staining reactions of the brain. Journal of Anatomy 1932.