

UNIVERSITATEA „REGELE FERDINAND I.“ DIN CLUJ
FACULTATEA DE MEDICINĂ
INSTITUTUL DE ISTOLOGIE ȘI EMBRIOLOGIE

No. 1236

TEHNICA MICROINCINERĂRII
IN ISTOLOGIE
SPODOGRAMA PIELEI
(CU O MICROFOTOGRAFIE)



TEZĂ

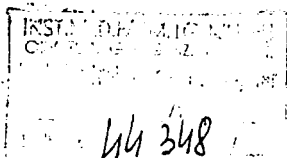
PENTRU

DOCTORAT ÎN MEDICINĂ ȘI CHIRURGIE
PREZENTATĂ ȘI SUSȚINUTĂ ÎN ZIUA DE 3 MARTIE 1938

DE

ȘTEFAN BOJIN

Preparator al Institutului de Istologie și Embriologie



24 MAY 2008

CLUJ
TIPOGRAFIA „CARTEA ROMĂNEASCĂ“
1 9 3 8

UNIVERSITATEA „REGELE FERDINAND I” DIN CLUJ
FACULTATEA DE MEDICINĂ

Decan : Prof. Dr. D. MICHAÏ

Profesori :

Clinica stomatologică	Prof. Dr. ALEMAN I.
Microbiologia	” ” BARONI V.
Fiziologia umană	” ” BENETATO GR.
Istoria Medicinii	” ” BOLOGA V.
Patologia generală și experimentală	” ” BOTEZ A. M.
Clinica oto-rino-laringologică	” ” BUZOIANU GH.
Istologia și embriologia umană	” ” DRĂGOIU I.
Semiologie medicală	” ” GOIA I.
Clinica ginecologică și obstetricală	” ” GRIGORIU C.
Clinica medicală	” ” HAȚEGANU I.
Medicina legală	” ” KERNBACH M.
Chimia biologică	” ” MANTA I.
Clinica oftalmologică	” ” MICHAÏ D.
Clinica neurologică	” ” MINEA I.
Igiena și igiena socială	” ” MOLDOVAN I.
Radiologia medicală	” ” NEGRU D.
Anatomia descriptivă și topografică	” ” PAPILIAN V.
Clinica chirurgicală } Medicină operatoare }	” ” POP A.
Clinica Infanțilă	” ” POPOVICI GH.
Farmacologia și farmacognozia (supl.)	” ” POPOVICI GH.
Chimia medicală	” ” SECĂREANU ȘT.
Balneologia	” ” STURZA M.
Clinica dermato-venerică	” ” TĂTARU C.
Clinica urologică	” ” ȚEPOȘU E.
Clinica psihiatrică	” ” ȚRECHIA C.
Anatomia patologică	” ” VASILIU T.
Igiena generală	Agr. ZOLOG M.
Fizică medicală	Conf. BĂRBULESCU N.

JURIUL DE PROMOȚIE :

Președintele tezei : Prof. Dr. I. DRĂGOIU

Membrii : { ” ” V. BOLOGA
 ” ” M. KERNBACH
 ” ” V. PAPILIAN
 ” ” T. VASILIU

Supleant : D-l Doc. Dr. P. VANCEA

Cuprinsul

Introducere.

Tehnica microîncinerării.

Montarea și examenul secțiunilor incinerate.

Constituția chimică a cenușei.

Localizarea topografică a materiilor minerale în spodogramă.

Noțiuni asupra structurii pielei.

Spodograma pielei normale.

Spodograma în tumori epiteliale maligne ale pielei.

Concluziuni.

Bibliografie.





Introducere

Cercetări numeroase de microchimie au arătat că, față de activitatea miraculoasă a plantelor și animalelor în timpul vieții, numărul elementelor chimice găsite în organism e relativ mic. Numai circa 20 de elemente din 93 câte sunt notate în tabloului lui Mendelejev sunt prezente și dintre acestea, numărul celor care se găsesc în mod obișnuit este chiar mai mic, căci elementele rare pot lipsi uneori complet. Aceste elemente sunt: carbon, oxigen, hidrogen, azot, sodiu, potasiu, litiu, calciu, magneziu, fosfor, fier, sulf, siliciu, arsen, cupru, mangan, fluor, clor, brom, iod.

În mod excepțional se pot găsi și altele, dar prezența lor în aceste cazuri e datorită unor împrejurări speciale sau unor cauze accidentale.

În organism elementele chimice se găsesc sub două forme: unele sunt în stare de săruri minerale, altele în stare de combinațiuni organice. Compușii organici se prezintă sub formă de substanțe proteice, care constituiesc cea mai mare parte din protoplasma celulară, sub formă de idrați de carbon și substanțe grase.

Materiile minerale din celule și țesuturi pot fi clasificate în două categorii: unele libere în mediile intermicelare, circulând aici în stare de molecule sau ioni, altele fixate prin adsorpție la suprafața miceliilor proteice sau chiar unite chimic cu ele.

Berzelius emițând teoria sa „a forței vitale”, credea că numai substanțele organice caracterizează viața, ele fiind produse exclusiv de ființele vii. Teoria s'a dovedit inexactă, căci în 1828 Wohler reușește pentru prima dată să obțină un compus organic prin sinteză, plecând de la substanțe anorganice (sinteza ureii).

Nu compușii organici determină și mențin viața în celule, căci „materiile proteice lipsite de orice substanță minerală ar fi ca moarte, ionii minerali sunt aceia cari aduc în ele viață”. (Policard). Acest fapt, și prezența lor în toate complexele lipo-

proteice care alcătuiesc protoplasma, ne explică importanța pe care o dau biologii acestor componenți celulari.

Prin metode precise de microanaliză organică (a cărei întemeietor este F. Pregl) s'a reușit să se evidențieze cantități infime de substanțe — miimi de miligrame — din aceste combinațiuni. În timp ce însă pentru chimiști aceste cantități infinitesimale au o valoare limitată, pentru biologi o analiză condusă așa de departe este de cea mai mare importanță, fiindcă astfel e posibil să se demonstreze prezența unor substanțe în celulele sau chiar în formațiuni mai mici: nucleii, mitocondrii, etc., și să se tragă concluzii asupra funcțiunii fiziologice sau patologice a elementelor anatomice.

Dar majoritatea reactivilor folosiți în microanalize au un efect toxic, deci pătrunzând în celulă omoară citoplasma, așa că e interesant de a preciza dacă aceia ce a fost găsit în celule, țesuturi sau organe erau și în celula vie, unde elementele se găsesc într'un echilibru dinamic extraordinar de labil, sau sunt formațiuni ce apar numai post mortem. În afară de aceasta, „colorațiunea unei preparațiuni microscopice cu anumiți reactivi, în scopul de a determina localizarea substanțelor minerale din organe, țesuturi și celule, nu este totdeauna o metodă lipsită de critică: afinitatea reactivilor coloranți, față de unele părți ale elementelor anatomice este în funcție nu numai de procesele chimice, ci și de diverse stări fizico-chimice (starea coloidală a țesutului și a colorantului)”. (I. Drăgoiu). Pentru aceste motive este necesar ca analiza microchimică să fie comparată cu preparațiuni lipsite de substanțe organice și lucrul acesta e posibil prin incinerarea preparațiunilor. Metoda mai are avantajul că permite evidențierea elementelor minerale „*in toto*”, în timp ce reactivii utilizați în istochimie, nu acționează decât asupra sărurilor ionizate sau ionizabile, lăsând neevidențiate sărurile minerale legate de moleculele organice. De exemplu, calciul nu poate fi pus în evidență total, până azi, decât prin microincinerare.

În toată literatura pe care am avut posibilitatea s'o studiez nu am găsit nici o lucrare din punct de vedere istologic asupra spodogramei pielei. Din încredințarea Dlui Profesor Ioan Drăgoiu, m'am ocupat în această teză cu tehnica microincinerării în istologie și cu spodograma pielei normale; comparativ am studiat aspectul spodogramei în 3 cazuri de epiteliom malign al pielei.

Istoric. A trecut un secol, de când pentru prima oară un chimist francez, *Raspail* (1833), a aplicat această metodă la țesuturile vegetale pentru a evidenția substanțele minerale din țesuturi. *Raspail* a remarcat faptul că forma țesuturilor nu pare a fi schimbată după îndepărtarea substanțelor organice.

Toate încercările ulterioare se fac numai asupra țesuturilor vegetale și metoda se precizează așa de mult, încât *Neumann-Molisch* au putut studia microchimic unele enclave din celulele vegetale.

Abia în 1910 *Liesegang* aplică acest procedeu și în istologia animală. Trebuie însă să recunoaștem că *Liesegang* făcea incinerarea numai ca un stadiu preparator pentru reacțiunile microchimice și nu-l interesa metoda din punct de vedere istologic, fapt ce reese din articolul publicat de el în *Biochemische Zeitschrift* din 1910.

Dintre cercetătorii care s'au ocupat cu acest nou mijloc de examinare trebuie să amintim pe *Herrera* (1912), *Prenant* (1919), *Schöller* (1922), *Policard* (1923), *Gordon H. Scott* (principalul exponent al acestei metode în America și fost elev al lui *Policard*), *Tschopp* (1929), *Schultz-Brauns* (1931), *Lison* (1936), *Simon Henry Gage* (1937), etc.

Metoda precisă de azi a microincinerării și utilizarea ei în scopul de a indica bogăția în substanțe minerale a unui țesut sau organ și mai ales de a determina localizarea topografică a acestor substanțe, se datorește lui *Policard*. Acest autor, studiind mecanismul osificării, era preocupat de chestiunea, dacă în țesutul conjunctiv din vecinătatea regiunilor în osteogeneză se găsește sau nu o acumulare de săruri de calciu. Fiindcă metodele istologice obișnuite erau insuficiente și nu-i permiteau să rezolve această problemă, a recurs la microincinerare, plecând dela ipoteza, că, dacă regiunile amintite sunt de fapt mai bogate în calciu, atunci și cenușa rămasă după incinerare va trebui să fie mai abundentă. Încălzind la roșu o secțiune istologică, întinsă pe o lamă de sticlă, constată cu surprindere că cenușa rămâne fixată în diversele puncte fără să se deplaseze. Din acest moment *Policard* aprofundează metoda și o perfecționează prin construirea unui microincinerator.

În ultimul timp *microincinerarea* se folosește aproape în toate cazurile unde se urmărește o orientare asupra cantității și repartiției elementelor minerale în țesuturi și organe.

Tehnica microincinerării

Principiul metodei constă în încălzirea la roșu închis a unei lame ce are fixată de ea o secțiune istologică. În felul acesta orice parte organică din secțiune se distruge și nu rămân decât materiile minerale fixe, în locurile unde se găseau înainte de incinerare. Cenușa produce textura preparațiunii, reprezentând „scheletul ei mineral“.

Dar cum ajungem la o astfel de preparațiune microscopică destinată microincinerării?

Având în vedere scopul urmărit, o metodă recomandabilă ar fi ca fragmente proaspete de țesuturi sau organe să fie secționate și incinerate fără o fixare prealabilă, care ar putea aduce modificări în componenta minerală. Sunt autori, ca de exemplu *Schultz-Brauns*, care incinerează țesuturi proaspete nefixate. Preparațiunile le obțin prin secționarea țesuturilor la microtomul de congelare, recoltând pe lamă secțiunile direct de pe cuțit, unde rămân rigide, căci și cuțitul e prevăzut cu un dispozitiv care îl răcește la -20° C. Metoda este excelentă, însă obținerea secțiunilor e foarte dificilă. În plus, se pare că și congelarea influențează asupra repartiției în țesuturi a sărurilor solubile, după cum reese din cercetările făcute de *Chambers și Hale* asupra vitezei de congelare a celulelor și țesuturilor.

O altă metodă recomandată de *Gersh*, constă în congelarea țesuturilor nefixate prin imersie în aer lichid. Piesele sunt apoi deshidratate prin evaporare in vid, la o temperatură de -20° C. și în urmă incluse la parafină.

Metoda pe lângă că pretinde o aparatură specială și este periculoasă, nu înlătură obiecțiunile aduse congelării obișnuite.

Secțiuni din piese nefixate se obțin mai ales din țesuturi vegetale și membrane epiteliale. Pentru altfel de organe recurgem la fixare.

Fixarea. Din tehnica istologică se știe că deseori este delicat de a alege un fixator, căci sunt numeroase calitățile care se cer

acestor reactivi. Pentru acest motiv se recurge în istologie, cu mai bune rezultate, la amestecuri fixatoare.

În microincinerare alegerea devine și mai dificilă. O condiție esențială — pentru a nu modifica raportul componentelor celulari — este, ca agenții fixatori să nu aducă și nici să îndepărteze substanțele minerale din celule sau țesuturi. Această condiție însă, nu poate fi pe deplin satisfăcută, orice fixator am întrebuișa, căci nu se poate evita, de exemplu, pierderea substanțelor minerale disolvate în plasma interstițială. Dar, deși nu avem fixatori care să permanentizeze constituenții structurali exact ca și în viață, totuși sunt reactivi care trebuie îndepărtați dela început. Astfel sunt fixatorii acizi cari nu pot fi utilizați, căci descompun sărurile insolubile ridicând elementele minerale, de asemeni nu pot fi utilizați fixatorii cu bază de crom, sublimat, etc., care având proprietatea de a se uni cu substanțele proteice vor contribui la formarea cenușei.

În general, fixatorii întrebuișați în microincinerare cu rezultate bune sunt *alcoolul etilic și formolul*.

Alcoolul cu toate că pătrunde greu în țesuturi și produce contracția elementelor, totuși pentru faptul că coagulează repede materiile proteice și este foarte puțin solvant pentru sărurile minerale existente în țesuturile animale, este un fixator indicat.

Dovada că pierderea materiilor minerale în timpul fixării în alcool absolut este minimă, a fost făcută de *Scott*, care prin analize chimice calitative nu găsește reacțiuni pozitive pentru *Ca*, *Mg*, *Na* și *K*, în lichidele alcoolice ce au servit în repetate rânduri la fixare.

Un bun fixator este formolul sau formalina în proporție de 10% din soluția comercială (40%). Când nu se ține cont de sărurile solubile în apă, atunci diluția formolului se poate face în apă distilată; când dorim însă, să păstrăm pe cât e posibil și aceste săruri minerale, atunci e indicat să facem diluția în alcool absolut. Cu rezultate bune se poate întrebuișa deci un amestec de 9 părți alcool absolut și 1 parte formol comercial. Acest formol deseori conține urme de acid formic, care pe lângă că „deteriorează citoplasma“, ar putea antrena elemente minerale, este bine ca să se neutralizeze printr'o cantitate suficientă de cretă și după câteva ore să se filtreze.

Sunt însă autori, ca de exemplu *Simon Henry Gage*, care admit că orice metodă de fixare cunoscută poate fi utilizată;

astfel întrebuițează fixatori cu bază de *bicromat de potasiu*, susținând că sărurile de crom și potasiu adăogate sunt cantitativ negliabile, în schimb rezultatele generale sunt mult superioare metodei alcool-formol, atât pentru aspectul istologic, cât și pentru aspectul de incinerare. Considerând scopul urmărit, e preferabil să nu sacrificăm, pe cât e posibil, exactitatea pentru aspect.

Fixatorul odată ales, se introduc în el bucăți subțiri din țesuturi și organe; în medie 24 - 48 ore sunt suficiente pentru fixare. Este bine ca țesuturile sau organele să fie incluse imediat după ce au fost fixate; dacă lucrul acesta nu e posibil se vor păstra în alcool absolut.

Incluziunea și lipirea. Piesele fixate pot fi incluse la parafină sau secționare prin congelare. Metoda de includere la parafină a pieselor ce urmează a fi incinerate nu diferă, în general, de cea obișnuită.

Singura deosebire constă în faptul că parafina trebuie să fie cât mai pură, așa că o parafină veche, care a mai servit la includere, nu poate fi întrebuițată, deși dă blocuri omogene și se taie mult mai bine ca una nouă. Pentru a remedia acest inconvenient, noi am ținut în rezervă mai multă vreme, la termostat, o parafină pură. Eventualele particule aflate în suspensie în lichidele necesare includerii, pot fi îndepărtate prin filtrarea acestora în momentul întrebuițării.

Dintre cele două metode: includerea la parafină și secționarea prin congelare, prima ni-se pare mai avantajoasă, pentrucă în genere parafina nu adăogă nimic la secțiuni, nu este absolut necesar să fie îndepărtată înainte de incinerare (dar aceasta este preferabil), se pot obține secțiuni mai fine, în serie și nu este nevoie să mai trecem secțiunile prin apă ca în cazul când se taie la microtomul de congelare. Este posibil să evităm și aici trecerea secțiunilor prin apă atunci când ne interesează sărurile solubile, dacă facem secțiuni groase, așa ca să le putem ridica direct de pe cuțit. Acest procedeu nu este însă recomandabil, căci rezultate bune și incinerățiuni frumoase se obțin numai cu *secțiuni fine de 3-5-7 μ*.

O altă metodă de culegere a secțiunilor direct de pe cuțit, este aceea amintită mai înainte-a lui *Schultz Brauns* — care întrebuițează un dispozitiv ce răcește cuțitul microtomului, pe care, secțiunile vor rămâne ca fine lamele de ghiață, de unde vor fi luate cu o pensă de asemeni răcită. Acest procedeu mai are

avantajul că secțiunile după ce au fost întinse pe lame, aderă intim de ele după desghețare și evaporarea apei, avantaj important, dacă avem în vedere că nu ne este permis să lipim secțiunile cu albumină-glicerină sau alte substanțe, și preparațiunile, mai ales acele bogate în elemente conjunctive, se răsucesc în timpul incinerării.

Piesele secționate la microtomul de congelare, care au fost recoltate în apă, se întind pe lame și se pare că rămân mai intim aderente, dacă se apasă secțiunea prin intermediul unei hârtii de filtru. Uneori tendința retractilă a elementelor conjunctive în timpul incinerării este așa de mare, încât învinge forța de adeziune dintre preparat și lamă. În aceste cazuri autorii recomandă să se mărească forța de adeziune prin lipirea marginilor secțiunii cu o soluție diluată de *silicat de potasiu*; deși nu este o metodă prea fericită, în lipsa altei posibilități se recurge la ea, ținând seamă la interpretarea rezultatelor de sărurile adăogate, care au contribuit la formarea cenușei.

Observându-se că rețracțiunea calorică a țesuturilor are loc mai ales între 50° și 100° C., *Policard și P. Ravault* recomandă ca rețracțiunea să se facă înainte de incluziune, prin fierberea pieselor în alcool de 90°, timp de 10 minute. În acest caz vom avea o rețracțiune în masă; secțiunile în timpul incinerării nu se vor mai retracta de loc sau extrem de puțin, așa că valoarea comparativă între un preparat incinerat și altul colorat este mai puțin relativă.

Piesele obținute prin secționarea la parafină fiind încrețite e necesar să fie întinse. În acest scop o lungime dorită din panglică se așează pe o lamă perfect curată, pe care am pus câteva picături de apă sau mai bine de alcool, pentru a evita acțiunea disolvantă a apei. Secțiunea se întinde așezând lama pe o placă încălzită sau trecând fața inferioară a lamei deasupra unei flăcări.

După ce secțiunile au fost întinse, este absolut necesar să punem lamele minimum 24 ore la termostat, la 38°, pentru a se evapora apa. Dacă am incinera imediat, riscăm ca apa de pe lamă, degajându-se sub formă de vapori, să ne disloce cenușa și deci interpretările topografice să fie eronate.

Pentru a determina mai ușor localizarea substanțelor minerale în secțiunile incinerate este recomandabil să le comparăm cu piese colorate. Când culegem secțiunile la gheață sau când

lipim din panglică secțiuni pentru incinerare, vom lipi și secțiunile imediat consecutive pentru colorare. Natural, pentru acestea din urmă ne este permisă metoda uzuală de lipire cu albumină Mayer.

Lamele, pe care sunt fixate preparatele destinate incinerării, trebuie să fie cât mai puțin fuzibile, altfel se sparg sau se îmoaie în timpul arderii și cenușa se va încrusta. Pentru a evita acest inconvenient, autorii recomandă de a întrebuiți lame de *quartz*, *Corax D* (care se întrebuițează pentru microscopul cu raze ultraviolete), sau lame *Pirex*; acestea rămân întotdeauna nealterate, dar au marele dezavantaj că sunt prea scumpe. Lama de mică plesnește deseori, iar cea de sticlă albă este ușor fuzibilă. Cu bune rezultate poate fi folosită și lama ordinară de sticlă verde, care este destul de rezistență la căldură; totuși în acest caz surprizele nu sunt excluse, așa că este bine dacă alegem sticle din mai multe surse și le determinăm rezistența prin ardere.

Incinerarea constituie operația cea mai delicată din întreaga tehnică; ea trebuie condusă cu o deosebită atenție, căci numai așa se pot evita rezultatele dubioase. Incinerarea se face cu o mai mare siguranță și ușurință în cuptoare electrice speciale numite *microincineratoare*, dotate cu un pirometru și un reostat, care permit să se reguleze temperatura în orice moment.

Noi, neavând un asemenea cuptor, am utilizat un hemicilindru fabricat din porțelanul așa zis „*chamotte*“, rezistând în cazul nostru la o temperatură de 1000° C. Una din extremități este închisă prin fabricație, cealaltă se poate închide cu un capac din același material, realizându-se astfel un mic cuptor, care se poate încălzi cu unul sau două becuri Bunsen. Rezultatele sunt satisfăcătoare. În nici un caz nu este permis să se facă incinerarea așezând lama direct pe o placă de fier sau cupru așa cum se recomandă uneori și după cum am încercat și noi, căci oxizii acestor metale, rezultați în timpul incinerării, se fixează întim pe fața de contact a lamei și fac imposibilă examinarea la microscop a preparațiilor.

Pentru obținerea celor mai optime rezultate, trebuie ca incinerarea să fie condusă extrem de lent și arderea să se facă la minimum necesar. O încălzire bruscă, pe lângă faptul că ne poate deplasa cenușa prin degajarea prea rapidă a gazelor rezultate din descompunerea materiilor organice, mai are incon-

venientul că silicații deveniți lichizi pot înconjura zonele încă în stadiul de carbonizare și să împiedece sau să întârzie foarte mult incinerarea acestor regiuni. Trebuie să facem deosebire între *carbonizare și incinerare*. O materie este carbonizată, când sub influența căldurii nu mai degajă vapori condensabili, adică vapori cari pot fi aduși în stare solidă sau lichidă prin răcire; această carbonizare nu are importanță pentru istologie și istochimie, spre deosebire de incinerare, unde compuşii organici au fost complet distruși prin căldură și eliminați sub formă de gaze sau vapori (acid carbonic, apă, etc.), rămânând numai elementele minerale.

O temperatură de 600°—700° C., adică până la *roșu închis*, e suficientă pentru ca substanțele organice să fie distruse.

timpul de incinerare nu poate fi stabilit, căci este o diferență foarte mare în ce privește timpul de distrugere a diferitelor substanțe organice. Chiar în aceeași preparațiune se observă în decursul incinerării faptul interesant că, în timp ce unele regiuni sunt aproape incinerate, altele — mai ales acele bogate în nucleii — rămân încă negre, așa că la un moment dat preparațiunea ne face impresia că a fost tratată cu un colorant nuclear, ca de exemplu ematoxilina ferică a lui Heidenhain. În general, 20 de minute sunt suficiente pentru o bună incinerare.

Noi am constatat că piesele incluse la parafină, dacă se incinerează într'un timp mai lung și anume ridicând temperatura foarte lent, rămân întotdeauna atașate de lame și nu se produce fenomenul neplăcut al răsucirii țesuturilor, deși am incinerat un organ bogat în elemente conjunctive (pielea).

Alți autori recomandă metode noi. Astfel *Tschopp* incinerează secțiunile într'un curent de oxigen, iar *Schultz-Brauns* într'un curent de azot. Ultimul procedeu, reducând formarea de produse gudronoase, prezintă avantajul că permite scoborârea temperaturii de incinerare la circa 500° C., micșorându-se astfel și posibilitatea de volatilizare a clorurilor.

Incinerarea este terminată când la examenul cu ochiul liber cenușa formată pe lamă are un aspect alb sau cenușiu. După răcire, secțiunile pot fi controlate prin examinare la microscop. În acest caz, în lumina transmisă, preparațiunile bine incinerate nu trebuie să mai arate nici o particulă neagră; prezența acestora denotă că incinerarea a fost incompletă, unele elemente rămânând încă în stadiul de carbonizare. De asemeni,

într'o incinerare bine condusă, tabloul cenușei sau *spodograma* trebuie să reproducă textura organului sau a țesutului incinerat. Dacă spodograma este difuză, încât nu mai putem recunoaște forma inițială a secțiunilor, înseamnă că, sau am incinerat prea rapid, sau că secțiunile nu au fost complet uscate înainte de incinerare.

Montarea și examenul secțiunilor incinerate

Cenușa de pe lamă putând fi ușor deranjată la cea mai mică atingere, este necesar să fie protejată prin acoperire cu o lamelă și este bine ca acoperirea să se facă imediat după incinerare, căci cenușa este de obicei foarte higroscopică și absorbind apă, imaginea microscopică a spodogramei devine difuză. Lamela nu poate fi însă aplicată direct, ci trebuie menținută la oarecare înălțime, căci prin greutatea ei poate disloca cenușa. Pentru a fixa lamela, *Simón Henry Gage* recomandă să se întrebuițeze ceară roșie, care în contact cu lama se solidifică brusc și nu riscăm ca să pătrundă pe sub lamelă până la spodogramă. Alți autori procedează în felul următor: încadrează cenușa cu balsam de Canada foarte gros și când e aproape uscat, încălzesc puțin lama, și așează repede lamela pe care o presează ușor.

Noi am lipit cu parafină, evitând pătrunderea acesteia până la preparațiune prin faptul că am făcut câte o bandă de parafină pe fiecare latură a lamelei; am așezat apoi lamela deasupra preparațiunii și cu o spatulă ce conține parafină aproape de punctul de solidificare am parafinat marginile lamelei. Banda de parafină ne-a servit de suport pentru lamelă și în același timp s'a opus pătrunderii parafinei topite până la spodogramă, atunci când am imobilizat lamela.

În toate aceste cazuri montarea s'a făcut în aer. Sunt însă cercetători cari folosesc medii de montare ca oleu de anilină, fenol, oleu de parafină, etc., dar aceste medii lichide dislocă foarte ușor cenușa sau întunecă detaliile fine.

Examenul secțiunilor incinerate. Având în vedere natura materialului examinarea spodogramei trebuie să se facă pe *fond negru*; în lumina transmisă detaliile nu pot fi observate, căci depozitele minerale sunt mai totdeauna transparente.

Noi am utilizat *condensatorul paraboloid a lui Sidentopf*, punând lama în contact cu suprafața superioară a condensatorului prin imersie cu apă destilată.

Localizarea istologică a sărurilor minerale în spodogramă este mult ușurată, după cum am amintit, prin comparație cu preparațiunile colorate. Este preferabil să avem două microscopae alături, unul cu fond negru pentru preparatul incinerat și altul cu câmp luminos pentru cel colorat; privind alternativ în cele două microscopae vom repera cu exactitate regiunile identice.

Piesele incinerate sunt mai satisfăcător studiate cu măriti mijlocii, fiindcă întrebuițând aperturi mai mici vom avea câmpuri mai largi și orientarea ne va fi mult ușurată. O apertură numerică de 0,65 (obi. 40 Zeiss) îndeplinește acest deziderat având în același timp și o suficientă putere rezolvantă.

Microfotografia făcută pe fond negru, constituie deasemeni o metodă foarte bună de examinare a spodogramei.

Simon Henry Gage atrage atențiunea că se obțin detalii interesante studiind secțiunile incinerate și cu microscopul cu raze ultraviolete și în lumina polarizată.

Constituția chimică a cenușei

Cenușele se deosebesc — după cum provin dela un organ sau altul — atât în ce privește aspectul lor, cât și din punct de vedere chimic.

După aspect *Policard* distinge: 1, cenușă foarte albă compusă din granule mari; 2, cenușă omogenă, cenușie, din granule foarte fine; 3, cenușă cu aspect albastrui din cauza difracțiunii luminei pe depozitul de minerale extrem de fine și 4, cenușă cu aspect omogen, cornos, fără structură granulară.

În realitate, diversitatea de aspecte este infinită și este probabil că fiecare aspect corespunde unei anumite categorii de celule.

Din punct de vedere chimic cenușele pot conține cloruri, sulfai, fosfați, carbonați de sodiu, potasiu, calciu, magneziu și fer.

Dela început trebuie însă precizat că identificarea acestor elemente poate fi făcută prin analize chimice calitative sau prin metode de analiză spectrală și nu prin simplă incinerare. Acest procedeu ne dă cantitatea relativă a sărurilor minerale

fixe și nu compoziția chimică a cenușei. Numai fierul și uneori sulful pot fi direct identificate în spodogramă, datorită faptului că oxidul de fier dă o culoare roșie cenușei în punctul unde se găsește, iar sulful o culoare galbenă; celelalte elemente nu se pot deosebi istologic unele de altele și aceasta este marea lacună a microincinerării.

În mod obișnuit, cenușa rezultată după incinerare nu reprezintă totalitatea elementelor minerale, care se găseau în esuturile sau organele în stare vie: unele elemente s'au pierdut prin diferite manopere de pregătire a secțiunilor, altele chiar în timpul incinerării. Pierderea acestor componenți celulari poate fi evitată prin anumite procedee de analiză chimică cantitativă, dar în felul acesta nu mai este vorba de o metodă istologică, ci de una de chimie analitică.

În cazul nostru o parte din substanțele minerale lipsesc. Astfel clorurii alcalini și alcalino-teroși sunt săruri foarte solubile în apă disolvându-se chiar până la 36%, la 15° C. (Na Cl), așa că venind în contact cu apa, o cantitate mai mică sau mai mare din cloruri va fi antrenată. În timpul incinerării se poate ca o parte din clorurii conținuți de țesuturi, să fie descompuși prin acțiunea acidului fosforic sau a fosfaților acizi și acidul clorhidric rezultat din această descompunere este pierdut. De asemeni clorurii alcalini, fiind săruri volatile la temperatura de incinerare, nu vor lua parte în totalitate sau chiar de loc la formarea cenușei, spre deosebire de clorurii alcalino-teroși cari rămân, dacă nu se arde la roșu viu, când devin și volatili.

Fosfații cenușei provin în parte din descompunerea substanțelor organice fosforate ca nucleoproteide, albumine fosforate, reticulină, etc. Prin incinerare aceste substanțe furnizează acid fosforic, care unindu-se cu bazele din cenușă dă fosfați ce corespund de obicei acidului ortofosforic, sunt deci ortofosfați: mono-bi sau trimetalici, alcalini și alcalino-teroși. Uneori cenușa poate conține și fosfați de fier, care provin ca și oxidul de fier, din combinațiunile organice feruginoase.

Sulfajii cari se găsesc în cenușa țesuturilor animale sunt sulfajii neutri de sodiu, potasiu, calciu și magneziu. Toate aceste săruri sunt mai mult sau mai puțin solubile în apă și insolubile în alcool, nu sunt volatile, așa că pierderea lor în timpul incinerării este minimă. Sulfajii provin în parte din descompunerea substanțelor organice ca de exemplu cherațina, colagenul, etc

Carbonații din cenușă sunt în cantitate mică și sunt reprezentați întotdeauna prin sărurile neutre ale acidului carbonic, căci în timpul incinerării bicarbonații eventual prezenți se descompun în carbonați neutri, bioxid de carbon și apă. Carbonații neutri pot fi alcalini și alcalino-teroși; cei alcalini nu sunt descompuși prin incinerare spre deosebire de cei alcalino-teroși; cari pot fi descompuși în oxizi de calciu și magneziu și bioxid de carbon. Carbonații provin în parte din arderea sărurilor alcaline și alcalino-teroase ale acizilor organici ca oxalați, tartrați, lactați, etc., în parte din descompunerea bicarbonaților.

Siliciul se combină cu calciu dând compuși silico-calcaeri. Elementele chimice ca sodiu, potasiu, calciu, magneziu și fier le-am amintit mai sus deodată cu anionii corespunzători.

Încercările făcute pentru a determina calitativ, *prin microchimie*, aceste săruri minerale în spodogramă nu au dat rezultate concludente, căci, dacă este posibil să se identifice diferitele elemente prin reacțiuni microcristalografice sau alte reacțiuni, în toate aceste cazuri menținerea substanțelor precis în locul unde se găseau pe spodogramă este aproape imposibilă.

Localizarea topografică a materiilor minerale în spodogramă

Când am definit principiul microincinerării, spuneam că avantajul acestei metode constă în faptul că materiile minerale fixe rămân în locul unde se găseau pe secțiune. Localizarea cenușei corespunde deci localizării substanțelor minerale în țesuturi, iar bogăția ei într'un punct este un indiciu de abundența elementelor minerale în acel punct.

În realitate, localizarea istologică a cenușei nu este așa de simplă, căci în timpul incinerării au intervenit factori cari au contribuit la deplasarea mai mult sau mai puțin accentuată a cenușei. Unul din acești factori perturbatori și poate cel mai important este retracțiunea calorică pe care am studiat-o arătând și metodele recomandate până acum, prin care se poate remedia în parte. Din cauza acestei retracțiuni, micile grămezi de cenușă nu vor fi situate precis în locul unde se găseau elementele minerale în secțiune, iar abundența cenușei într'o regiune a spodogramei nu totdeauna este rezultatul acumulării materiilor

minerale în țesuturile și celulele respective, ci poate fi datorită unui fenomen de retracțiune calorică, care nu trebuie pierdut din vedere la interpretarea rezultatelor.

Un alt factor de conturbare este prezența materiilor grase în țesuturi sau organe. În timpul incinerării aceste substanțe se lichefiază și difuzând, vor produce deplasări ale cenușei, așa că topografia spodogramei deasemeni nu va fi corectă.

Noi făcând includerea la parafină am fost scutiți de această eroare prin faptul că am trecut piesele până la includere printr'o serie de solvanți ai grăsimilor. Când se secționează însă la microtomul de congelare, fie organe fixate, fie fragmente de țesuturi proaspete nefixate, este necesar — mai ales dacă organele sunt bogate în materii grase. — să se disolve în prealabil aceste substanțe. Îndepărtarea lor se face dacă se țin piesele înainte de secționare în acetonă sau eter anhidru timp de 3—5 ore sau într'un amestec de alcool-cloroform părți egale timp de 10—15 minute.

În concluzie, când se interpretează localizarea topografică a materiilor minerale în spodogramă nu trebuie să pierdem din vedere acești doi factori perturbatori.

Noțiuni asupra structurii pielei

Pielea este un organ de natură ectodermică și mezenchimatoasă în care distingem la examenul microscopic 3 straturi fundamentale: unul superficial, *epiderma*; altul mijlociu, *derma*; și în fine cel mai profund *ipoderma*.

A. Epiderma este formată dintr'un epiteliu de tip stratificat pavimentos; prin disociație mecanică sau chimică ea se desface în două straturi: corpul mucos al lui Malpighi și stratul cornos. Mergând din profunzime spre suprafață distingem în epidermă 6 straturi dintre care, primele 3 aparțin corpului mucos, iar celelalte stratului cornos.

1. *Stratul bazal sau germinativ* este constituit dintr'un rând de celule cilindrice dispuse pe o vitroasă care delimitează epiderma de derma subjacentă. Aceste celule în continuă activitate mitotică prezintă un nucleu mai apropiat, de obicei, de zona apicală și o citoplasmă bogată în granulațiuni de melanină,

pigment provenit din dezintegrarea materiilor proteice, de culoare brună sau neagră, fin granulat, conținând sulf în proporție variabilă; acest pigment se găsește și în cromatocitele epiteliale descrise de *Langherhans* în zona profundă a epidermei.

2. *Stratul filamentos* are o grosime variabilă cu diferitele regiuni fiind format din 5—20 rânduri de celule poliedrice, despărțite între ele prin spații clare în care circulă limfă, dar solidarizate prin tonofibrile; citoplasma acestor celule prezintă foarte multe granulațiuni mitocondriale.

3. *Stratul granulos* este constituit din 1—5 rânduri de celule fuziforme, lățite, cu un nucleu pe cale de degenerescență și cu o citoplasmă bogată în granulațiuni de cheratohialiană (*Waldeyer*), de dimensiuni de variabile, colorabile prin culori acide sau bazice. Tonofibrilele intercelulare sunt scurte, iar în interiorul celulelor sunt limitate în zona periferică a citoplasmei.

4. *Stratul lucid* apare ca o bandă subțire, clară și refringentă; este format din mai multe rânduri de celule turtite, translucide, care și-au pierdut caracterele vitale. Celulele din zona superficială a acestui strat conțin în citoplasmă o substanță omogenă, caracteristică, numită eleidină, colorabilă în roșu prin carmin, spre deosebire de celulele din zona profundă care nu conțin granulațiuni de cheratohialină și alcătuiesc *stratul intermediar al lui Ranvier*.

5. *Stratul cornos* propriu zis este format din celule veziculoase, cheratinizate, lipsite de nuclei, conținând o substanță grasă ce reduce acidul osmic.

6. *Stratul exfoliator sau foliaceu* este cel mai superficial și e format din celule epiteliale cornificate ce se descuamează încontinuu.

B. *Derma* reprezintă stratul situat imediat sub epidermă. Originea ei este mezenchimatoasă și este constituită dintr'un strat superficial *reticular sau papilar*, care prezintă ridicături cilindroconice numite *papile dermice*. Stratul reticular are structura unui țesut conjunctiv tânăr cu fibre colagene subțiri, fibre elastice și elemente celulare caracteristice țesutului conjunctiv areolar. Mai găsim la acest nivel corpusculi senzitiv și o vascularizațiune abundentă. Sub acest strat reticular avem derma propriu zisă formată din fâșii conjunctive groase, strâns unite, pe care sunt dispuse fibrocite și din fibre și lame elastice care se continuă cu rețeaua elastică din stratul papilar.

C. Ipoderma continuă derma în profunzime venind în raport cu organele profunde de care este separată prin „*fascia superficialis*“. În constituția ipodermei găsim un țesut conjunctiv lax cu fășii colagene orientate paralel sau oblic cu suprafața pielei: *retinacula cutis*, și elemente grăsoase dispuse sub formă de lobuli cari întrețin raporturi intime cu vasele sanghine. În stratul ipodermic își au sediul partea profundă a glandelor sudoripare, mușchii arectori ai perilor și diverși corpusculi sensitivi.

Glandele cutanate și părul. Glandele cutanate sunt de 2 tipuri: glane *sebacee* și glande *sudoripare*; ambele sunt diferențiate din epidermă.

Glanda sebacee este de tip acinos, simplu sau compus. Segmentul secretor este polistratificat, celulele din centru sunt degenerate, mari, pline cu vezicule grăsoase; secrețiunea glandei este de tip olocrin.

Glandele sudoripare, diseminate inegal în piele, sunt glande de tip tubulos. În porțiunea secretorie găsim două straturi de celule: un strat extern contractil format din celule mioepiteliale și un strat intern secretor format din celule glandulare. Canalul excretor este constituit la nivelul dermei dintr'un epiteliu bistratificat; produsul secretat numit sudoare este un lichid incolor bogat în săruri minerale.

Părul este o producțiune epidemică cornoasă; prezintă o porțiune liberă *tulpina sau tigiul*, și o porțiune implantată în grosimea pielei, *rădăcina*, terminată printr'o umflătură ovoidă numită bulb. La partea profundă bulbul prezintă o excavațiune în care pătrunde țesut conjunctivo-vascular tânăr din derm, alcătuind papila părului. În constituția părului propriu zis găsim elemente celulare cu o evoluție ascendentă ca și în epidermă; aceste elemente se dispun, dinăuntru în afară, în 5 straturi concentrice: *măduva, scoarța și epidermicula*.

Rădăcina anturată de tecile și organele anexe constituie în totalitate foliculul pilo-sebaceu. Tecile sunt în număr de trei: două de natură epitelială și după situația lor față de filamentul pilos deosebim o *teacă epitelială internă* și o *teacă epitelială externă* și una de natura conjunctivă, *teaca fibroasă*.

Mușchiul arector, anexat împreună cu glanda sebacee foliculului pilos, este format din fibre netede.

Spodograma pielei normale

Materialul întrebuințat l-am recoltat dela om, din regiunea parasternală, pulpa degetelor și pielea păroasă a capului. Secțiunile au fost pregătite, incinerate și examinate după tehnica descrisă la capitolul respectiv.

Urmărind secțiunile cu ochiul liber în timpul incinerării și mai ales întrerupând arderea în diferite timpuri și examinând la microscop, am constatat că incinerarea se face cu o ușurință și rapiditate inegală, în raport cu diversele straturi; în timp ce unele regiuni sunt incinerate, altele sunt în stadiu de carbonizare. Foarte ușor și rapid se incinerează ipodermă, persistând la acest nivel numai traveele conjunctive dintre lobulii adipoși și bulbul părului, cari se incinerează mai greu. Stratul filamentos și cornos deasemeni nu dau naștere la formațiuni gudronoase abundente care să necesite un timp mai lung de incinerare. Mai greu se incinerează stratul bazal al lui Malpighi și țesutul conjunctiv dermic și foarte greu stratul granulos din epidermă, care rămâne multă vreme în stadiu de carbonizare, apărând ca o fină linie brună-neagră.

Examenul microscopic al spodogramei ne arată că materiile minerale sunt repartizate inegal în cele 3 straturi fundamentale ale pielei, rezidiul mineral fiind mai abundent în epidermă decât în dermă și ipodermă; ultimul strat lasă extrem de puțină cenușă, (vezi microfotografia).

În epidermă, la nivelul corpului mucos al lui Malpighi, elementele minerale sunt reprezentate printr'o cenușă omogenă, cenușie, compusă din granule fine. În stratul filamentos se constată în majoritatea spodogramelor un aspect vacuolar; celulele poliedrice din acest strat sunt net individualizate prin faptul că zona periferică a citoplasmei este mai bogată în substanțe minerale decât zona citoplasmică perinucleară. Din această cauză și depozitul nuclear este mai evident în spodogramă la acest nivel.

În stratul cornos substanțele minerale se prezintă sub formă de granule mari, mai strălucitoare decât granulele din celelalte straturi ale epidermei. Materiile anorganice sunt dispuse în șiruri liniare, ondulate, paralele, amintind dispoziția istologică a stratului cornos.

În dermă, elementele minerale se prezintă sub formă de granule mari, inegale, cu un aspect alb-strălucitor. În stratul

papilar al dermei se găsesc și mici puncte roșii, uneori izolate, alteori grupate mai multe laolaltă, care sunt datorite probabil oxidului de fer rezultat din descompunerea emoglobinei, căci știm că în această regiune există o bogată rețea de vase sanghine,

La nivelul aparatului pilo-sebaceu se constată că tecile părului dau o cantitate mai mare de cenușă decât filamentul pilos și din cele trei straturi componente ale părului propriu zis, se pare că scoarța este mai bogată în elemente minerale.

Glandele sudoripare lasă deasemeni mai multă cenușă decât glandele sebacee (vezi microfotografia), fapt ce ar explica cantitatea mare de săruri minerale eliminate în sudoare de aceste glande.

Pentru a constata dacă este prezent calciul în piesele incinerate am executat reacția micro-cristalografică recomandată de Policard. Metoda constă în depunerea, cu ajutorul unei micro-pipete, a unei picături foarte mici de acid sulfuric 5%, în dreptul unde facem examinarea. În cazul când calciul este prezent se formează foarte repede cristale de gips, ușor de recunoscut, având aspectul caracteristic de lance. Reacțiunea este specifică, dar nu poate fi vorba în acest caz de o localizare precisă, căci oricât de mică ar fi picătura, ea tot va disloca elementele minerale. Ca metodă topografică istologică și nu citologică, ea totuși ne poate servi.

În spodograma pielei am constatat reacția pozitivă pentru calciu la nivelul dermei.

Spodograma în tumorile epiteliale maligne ale pielei

În 3 cazuri de epiteliom malign al feței (cancer bazo-celular), am studiat cum se comportă pielea tumorală față de incinerare și ce aspect prezintă spodograma.

Materialul a fost recoltat cu ajutorul cușitului electric după regulile obișnuite biopsiei, iar spodogramele au fost obținute urmând aceeași tehnică descrisă.

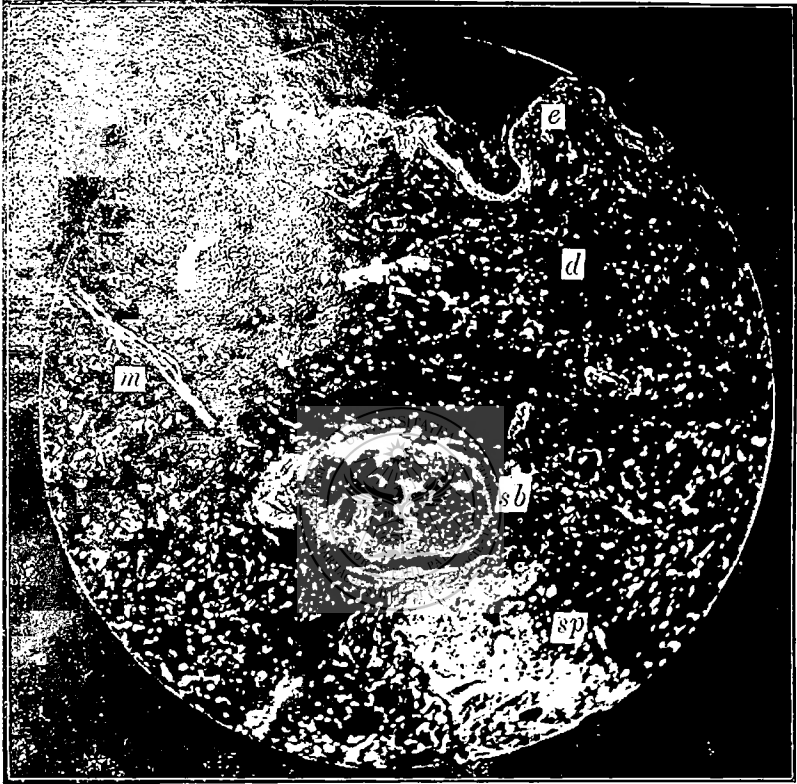
Se constată în aceste cazuri patologice că timpul de incinerare al secțiunilor trebuie mult prelungit, din cauza maselor epiteliale neoplazice care rezistă incinerării. Faptul își are explicația în bogăția mare de nuclei a țesutului canceros și am văzut că aceste părți constitutive celulare necesită o ardere mai îndelungată.

În regiunile neinvadate de procesul tumoral, spodograma prezintă același aspect ca și în cazul pielei normale, cu excepția dermei din jurul țesutului neformat, care este mai bogată în elemente minerale.

La periferia maselor tumorale se observă că în zona ce corespunde țesutului în plină activitate proliferativă, sărurile minerale sunt foarte puține, spre deosebire de zona centrală unde materiile minerale sunt mult mai abundente. Faptul acesta se încadrează în constatarea generală, că celulele tinere, pe cale de creștere sau celulele în activitate mitotică, lasă un reziduu mineral mai puțin abundent decât elementele aflate sau degenerate.







Secțiune de 6μ grosime în pielea normală de om; regiunea sternală.
Microfotografia spodogramei pe fond negru — $100\times$ e, epiderma; d, derma;
sb, glandă sebacee; sp, glomerul sudoripar; m, mușchiul arector al părului.



CONCLUZIUNI

1. Microincinerarea este o metodă istologică care servește pentru a constata abundența și localizarea sărurilor minerale în celule și țesuturi.

2. În secțiunile bine incinerate, tabloul cenușei sau spodograma reproduce exact textura țesutului sau a organului.

3. Este recomandabil ca examenul microscopic al spodogramei să se facă pe fond întunecat; detalii importante ne arată de asemenea și microfotografia executată în aceleași condițiuni.

4. Cenușa rezultată nu reprezintă totalitatea sărurilor minerale care se găseau în elementele anatomice vii: unele s'au pierdut prin pregătirea secțiunilor pentru incinerare, altele s'au pierdut în timpul incinerării.

5. Metoda microincinerării ne dă cantitatea relativă a sărurilor minerale dintr'un țesut sau organ, nu însă și natura chimică a acestor săruri. Numai oxidul de fier poate fi identificat direct la examenul microscopic al spodogramei.

6. Incinerarea pielei normale se face cu o iuțeală inegală în diferitele straturi. În spodograma acestui organ constatăm următoarele:

a) la nivelul epidermei cenușa are un aspect omogen, cenușiu, fin granular și este mai abundentă decât în celelalte straturi;

b) în dermă, cenușa este puțin abundentă și e formată din granule mari albe-strălucitoare (reacțiunea microcristalografică pentru Ca este pozitivă);

c) foliculul pilos este mai bogat în elemente minerale decât părul propriu zis;

d) glandele sudoripare lasă un reziduu mineral mai abundent decât glandele sebacee.

7. În unele tumori epiteliale maligne ale pielei incinerarea se face mai greu și necesită un timp mai îndelungat; sărurile minerale în aceste tumori par a fi mai abundente în centrul țesutului decât la periferie.

Văzută și bună de imprimat.

Decan :

(ss) **Prof. D. Michail**

Președintele tezei :

(ss) **Prof. Ioan Drăgoiu**

BIBLIOGRAFIE

- Arthus (M.)*, Précis de chimie physiologique. Paris 1932.
- Chambers et Hale (H. P.)*, Proc. Roy. S. 110, pag. 536 (1932).
- Drăgoiu (I.)*, Microincinerarea. Cluj medical 8, pag. 491 (1936).
- idem*, Elemente de istologie și de tehnică microscopică. Cluj 1953.
- Gage (S. H.)*, The Microscopie. New-Jork 1936.
- Liesegang (R. E.)*, Die Veraschung von Mikrotomischnitten, Biochemische Zeitschrift, 1910
- Lison (L.)*, Histochemie animale. Paris 1936.
- Policard (A.)*, Recherches histochimiques sur la teneur en cendres de l'ovaire humain. C. R. Soc. Biol. 89, p. 533 (1925).
- idem*, La microincinération et son intérêt dans les recherches histochimiques. Bull. Histol. appl. 1, p. 26 (1924).
- idem*, Part prise par les canaux excreteurs dans la formation des composés calcaires de la salive. Bull. Histol. appl. 3 (1926).
- idem*, Six conférences d'Histophysiologie. Paris 1935.
- Policard (A.) et Noël (R.) et Pillet (D.)*, Etude histochim. d. variations d. la teneur en cendres du tissu hépatique suivant divers régimes. C. R. Soc. Biol. 91, p. 1219 (1924).
- Policard (A.) et Pillet (D.)* Recherches histochim. s. l. teneur en matières minérales fixes d. cancers expér. C. R. Soc. Biol. 92, p. 272 (1925).
- Policard et Leulier*, Étude critique sur les méthodes de caractérisation histochim. du phosphore. Bull. Histol. appl. 2, p. 22 (1925).
- Policard (A.)*, Recherches histochim. sur la rapidité de minéralisation et la teneur en cendres des diverses parties des celules. C. R. Soc Biol. 89, p. 533 (1932).
- Romeis*, Taschenbuch der mikr. Technik. München. Berlin 1932.
- Schultz-Brauns. Verh. d. Path. G.* 26, p. 153 (1931).
- Tschopp (E.)* Spodographie. Handbuch der Mikr. Anat. des Menschen B. 1, p. 569 (1929).
- Verne (J.)* Les pigments dans l'organisme animal. Paris 1926.