

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

Nr. 1497

CONTRIBUȚIUNI

la fixarea și colorarea granulelor
din mastocite.



DOCTORAT ÎN MEDICINĂ ȘI CHIRURGIE

PREZENTATĂ ȘI SUSTINUTĂ ÎN ZIUA DE 9 NOV. 1939

DE

ALEXANDRU I. EPURESCU

Preparator la Institutul de Istologie și Embriologie.

CLUJ

„PALLAS” INSTITUT DE ARTE GRAFICE COOP. IND.

Strada A. Vlăhuță No. 3.

1939.

CONTRIBUȚIUNI

la fixarea și colorarea granulelor
din mastocite.



TEZĂ

PENTRU

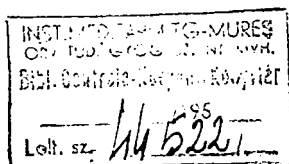
DOCTORAT IN MEDICINĂ ȘI CHIRURGIE

PREZENTATĂ ȘI SUSȚINUTĂ ÎN ZIUA DE 9 NOV. 1939

DE

ALEXANDRU I. EPURESCU

Preparator la Institutul de Istologie și Embriologie.



24 MAY 1939

CLUJ

„PALLAS“ INSTITUT DE ARTE GRAFICE COOP. IND.

Strada A. Vlăhufă No. 3,
1939.

Decan: Prof. Dr. I. DRĂGOIU

Profesori:

Clinica stomatologică	D-l. Prof. Dr.	<i>Aleman I.</i>
Microbiologie	” ” ”	<i>Baroni V.</i>
Fiziologia umană	” ” ”	<i>Benetato Gr.</i>
Istoria medicinei	” ” ”	<i>Bologa V.</i>
Patologia generală și experimentală	” ” ”	<i>Botez A. M.</i>
Clinica oto-rino-laringologică . . .	” ” ”	<i>Buzoianu Gh.</i>
Istologia și embriologia umană . .	” ” ”	<i>Drăgoiu I.</i>
Semiologie medicală	” ” ”	<i>Goia I.</i>
Clinica ginecologică și obstetricală	” ” ”	<i>Grigoriu Cr.</i>
Clinica medicală :	” ” ”	<i>Hațieganu I.</i>
Medicina legală	” ” ”	<i>Kernbach M.</i>
Chimia biologică	” ” ”	<i>Manta I.</i>
Clinica oftalmologică	” ” ”	<i>Michail D.</i>
Clinica neurologică	” ” ”	<i>Minea I.</i>
Igiena și igiena socială	” ” ”	{ <i>Moldovan I.</i>
Radiologia medicală	” ” ”	{ <i>M. Zolog</i>
Anatomia descriptivă și topografică	” ” ”	<i>Negru D.</i>
Clinica chirurgicală }	” ” ”	<i>Papilian V.</i>
Medicina operatoare }	” ” ”	<i>Pop Al.</i>
Clinica infantilă	” ” ”	<i>Popoviciu Gh.</i>
Farmacologia și farmacogn. (supl.)	” ” ”	<i>Popoviciu Gh.</i>
Biologia generală	” ” ”	<i>Racoviță E.</i>
Chimia medicală	” ” ”	<i>Secăreanu Șt.</i>
Balneologie	” ” ”	<i>Sturza M.</i>
Clinica dermato-venerică	” ” ”	<i>Tătaru C.</i>
Clinica urologică	” ” ”	<i>Țeposu E.</i>
Clinica psihiatrică	” ” ”	<i>Urechia C.</i>
Anatomia patologică.	” ” ”	<i>Vasilii T.</i>
Fizica medicală	Conf. ”	<i>Bărbulescu N.</i>
Clinica bolilor infecțioase	” ” ”	<i>Gavrilă I.</i>

JURIUL DE PROMOTIE

Președinte: D-nul Prof. Dr. I. Drăgoiu

Membrii : { ” ” ” *V. Papilian*
 ” ” ” *T. Vasiliu*
 ” ” ” *M. Kernbach*
 ” ” ” *I. Minea*

Supleant: Dl. Conf. Dr. P. Vancea,

Cuprinsul.

Introducere.

Citologia Mastocitelor și Clasmatocitelor.

Fiziologia Mastocitelor și Clasmatocitelor.

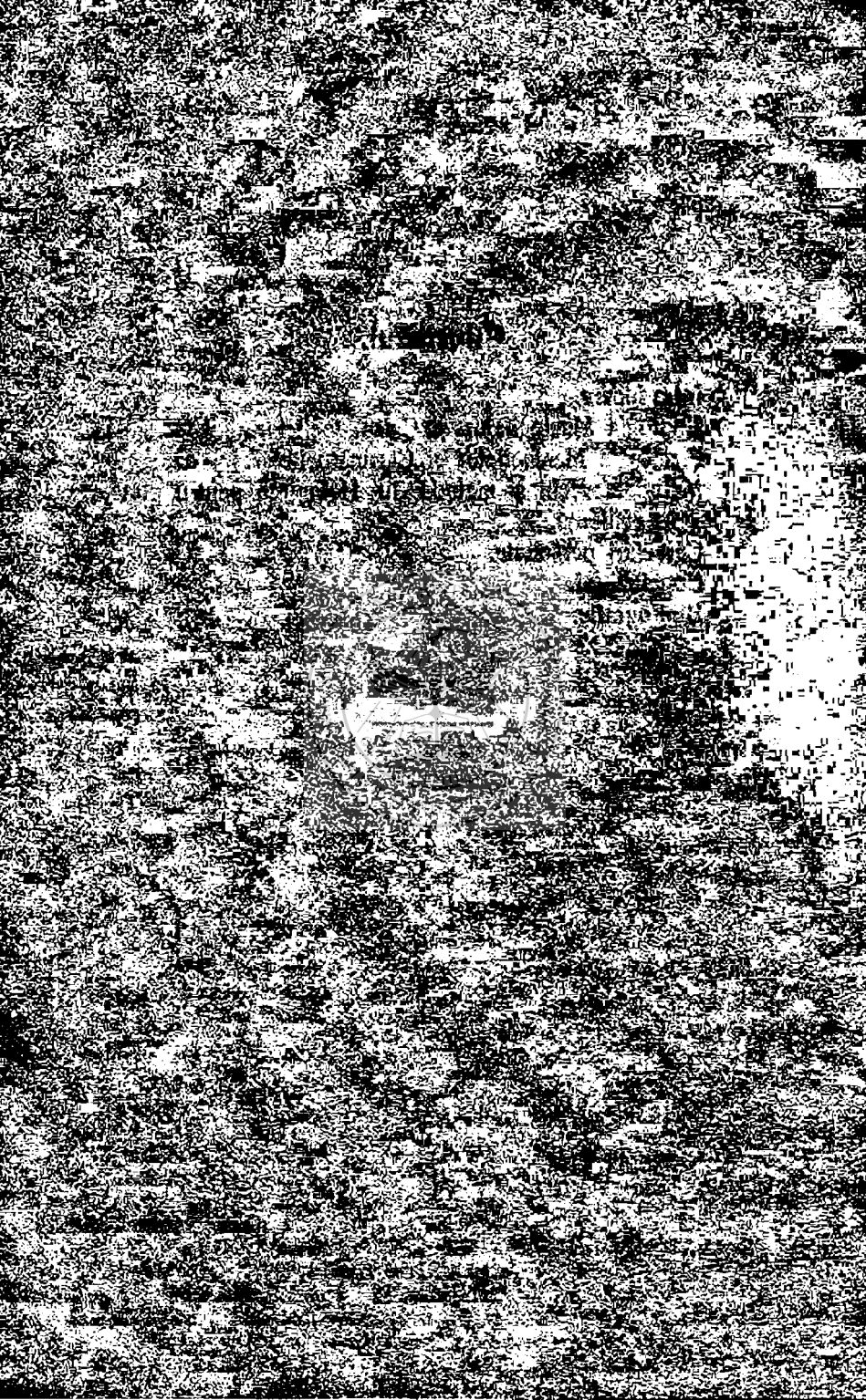
Metodele vechi și metoda lui Holmgren pentru punerea lor în evidență.

Cercelări personale.

Concluziuni.

Bibliografie.





Introducere.

Solubilitatea mare a granulelor metacromatice din mastocite, care nu a putut fi înlăturată aproape prin nici unul din fixatorii existenți până astăzi, a determinat pe mulți cercetători să facă alte încercări și au ajuns la concluzia că tratarea acestor celule trebuie să aibă drept condiție esențială, cunoașterea exactă constituției lor chimice.

În țesuturile colorate pentru punerea în evidență a granulelor metacromatice, apăreau totdeauna insule metacromatice în jurul celulelor. Acest fenomen era datorit faptului că fixatorii și coloranții fiind în soluție apoasă, au dizolvat pe alocurea granulele metacromatice, iar substanța metacromatică sub această nouă formă a difuzat la periferia celulei. Nici fixarea cu alcool nu s'a dovedit prea mult superioară, decât în cazul când avem de lucru cu mastocite, care au granule greu solubile în apă. Lucrând cu mastocite, care au granule ușor solubile în apă, nu obținem rezultate așa bune. Dacă fixării îi urmează o colorație cu coloranți apoși vom găsi granulele mai mult sau mai puțin spălate.

Din cercetările lui Wilander și Holmgren, rezultă că mastocitele conțin un sulf-polyster cu aceleaș proprietăți ca și heparina. După acești autori ar trebui să considerăm mastocitele ca locul de producere al heparinei în organism. Totalitatea mastocitelor ar constitui o glandă cu secreție internă, afirmație, făcută de altminteri, cu mult înainte, de o serie întregă de autori. (Maximow, Lehner). Holmgren și Wilander își sprijină cercetările lor pe analiza chimică și istologică a unei serii de diferite organe.

Ceva mai târziu, Jorpes, Wilander și Holmgren, au căutat localizarea și producerea heparinei în pereții vasculari.

Ehrlich a putut să demonstreze metacromazia granulelor mastocitelor prin ajutorul colorației cu violet de Dahlia.

În lucrarea lui Lison pe acest teren, găsim pentru prima oară un punct de reper în privința aplicării fenomenului de metacromazie în tehnica istologică de colorare. După el, metacromazia este un fenomen caracteristic al esterilor sulfurici de tipul $R-OSO_3-H$. Metacromazia ar fi deci o reacție specifică.

Jorpes susține că heparina descoperită de Howel este un poly-ester al acidului sulfuric și acesta se colorează, cum a arătat Lison, metacromatic. După el heparina dă cu albastru de toluidină o metacromazie bună. Atât heparina cât și granulele mastocitelor stau, așa dar, într'o relație „stochiometrică”. Am putea spune că granulele mastocitelor constau dintr'un ester al acidului sulfuric cu efect de heparină

Holmgren și Wilander, au fixat diferitele țesuturi în acetat bazic de plumb, bazându-se pe faptul că heparina este precipitată de acest fixator și cu toată siguranța acelaș lucru se va întâmpla cu granulele mastocitelor, care stau în raporturi foarte strânse, din punct de vedere chimic, cu heparina.

Granulațiuni cu acelaș proprietăți să găsec și în clasmatocitele batracienelor, care ne pot forma un documentat material demonstrativ.

Ciotologia mastocitelor și clasmaticitelor.

Aceste celule se găsesc în mod normal în țesutul conjunctiv ca elemente componente alături de celelalte celule ale acestui țesut, de fibrele conjunctive, fibrele elastice și substanța fundamentală. Știm că aceste elemente se grupează, adaptându-se diverselor funcțiuni mecanice, de legătură, nutritive și după cum sunt grupate deosebim o serie de variații de țesut conjunctiv. În unele din aceste variații vom găsi toate elementele reprezentate în proporție aproape egală; în altele însă predomină numai unele din ele, celelalte putând lipsi în totalitate sau în parte. Celulele mastocite și clasmaticite se găsesc în abundență în varietatea de țesuturi conjunctive în care toate elementele sunt reprezentate în proporție aproape egală și anume în țesutul conjunctiv lax, difuz, areolar sau celular.

a) **Mastocitele, labrocitele, celulele „Mast“ (Mastzellen).** Ele au fost descoperite la 1877 de către Ehrlich în țesutul conjunctiv și descrise mai târziu, cu precizie, de elevul său Westphal (1880). De atunci au constituit obiectul a numeroase cercetări. Din acest punct de vedere sunt elocvente lucrările lui Maximow (1906) și Weidenreich (1911), apoi decurând amănunțita monografia a lui Lehner (1924) și cercetările lui Michels.

Mastocitele apar la toate mamiferele în țesutul conjunctiv lax, embrionar. Numărul lor variază atât cu specia animală, cât și cu regiunea corpului de unde provine acest țesut. Au fost găsite la toate vertebratele inferioare afară de câteva specii de pești. Caracterul principal al acestor celule este prezența în citoplasmă a unor granule, care se colorează electiv metacromatic, cu culori bazice de anilină (după al-

bastru de metilen sau tionină granulele se colorează în roșu-purpuriu). Granulațiunile se distrug în apă, nu se dizolvă în alcool, ether, benzină și cloroform. Substanțele alcaline și sărurile alcaline le dizolvă după o acțiune mai îndelungată. Fiindcă granulațiunile sunt greu de păstrat, mastocitele au fost confundate, în unele cazuri, cu alte celule conjunctive. Intrebuințând metode de cercetare proprii, deosebirea dintre mastocite și celelalte forme de celule ale țesutului conjunctiv nu mai prezintă nici o greutate.

Forma exterioară a acestor celule este foarte variată. În special mastocitele mari de șobolan sau șoarece sunt sferice sau ovale, aranjate în grupe. — Uneori, din cauza presiunii reciproce, prezintă multe expansiuni, având o formă neregulată. — La om și la cele mai multe mamifere sunt mari, neregulat rotunde, ovale, sau alungite. Deseori au prelungiri scurte. Ele par a se acomoda în mărimea și forma pe care o prezintă, spațiilor libere care se găsesc în țesuturi. La suprafața fasciculelor groase colagene se lătesc, fibrele colagene și elastice întinse aplicate se înfundă în citoplasma lor; în apropierea vaselor și în spațiile înguste ale țesutului conjunctiv sunt fusiforme; între celulele grăsoase sunt comprimate, prezentând expansiuni. În țesutul conjunctiv lax mastocitele sunt împrăștiate fără nici o ordine printre celelalte celule fixe, fibrocite, forma imobilizată a celulelor migratorii, etc. . . . Mai adesea formează grupuri mici cari amintesc grupurile izogenice ale celulelor cartilagineoase. (Lehner) Le găsim apoi în număr mare adunate în jurul vaselor, mai ales la șoarece și șobolan, în grupuri dese sau rânduri lungi.

Nucleul este relativ mic, adeseori excentric, rotund, oval, mai rar lobat. În mastocitele fusiforme ale vertebratelor inferioare se găsesc uneori doi nuclei. În interiorul nucleului sunt mase cromatice de diferite mărimi, care se colorează slab cu culori bazice din anilină, din contra intens cu ematoxilina ferică. Nucleoli adevărați nu au putut fi observați. Colorarea metacromatică a nucleului în preparatele fixate a fost considerată de unii autori ca un produs arti-

ficial, rezultat din imbibarea lui cu substanța granulelor dizolvate (Maximow 1906).

Downey dă o altă interpretare prezenței părților metacromatice în nucleul mastocitelor tinere. Nu ar fi decât dovada participării active a cromatinei nucleare la dezvoltarea granulațiilor specifice.

Uneori, pe lângă o poziție potrivită a celulei, cu ajutorul ematoxilinei ferice, se poate pune în evidență, lângă nucleu, o pereche de centrioli (diplosom, Maximow).

Granulațiile celulelor „Mast“ nu sunt absolut bazofile. Ele se pot evidenția în anumite împrejurări și cu ematoxină sau culori de anilină acide. Intensitatea colorației și gradul metacromaziei poate varia după specia animală, regiunea corpului și poate după vârsta mastocitului sau a granulației respective.

În ceea ce privește compoziția chimică a granulațiilor, s'a presupus de unii, pe baza colorării metacromatice cu culori bazice de anilină, că ar fi vorba de o materie mucosă sau lipoidală sau asemănătoare mucusului. Însă nu s'a putut verifica această teorie.

Nici presupunerea unei înrudiri cu acidul condroitin sulfuric nu are mai multă valoare.

Substanța granuloasă a mastocitelor a fost asemănată cu incluziunile din corpul protistelor, care se colorează metacromatic, așa numitul „Volutin“ (Guillermond și Movas, 1908).

O altă teorie, pe o bază mai științifică, este cea susținută de Holmgren și Wilander, despre care am mai vorbit la partea introductivă. Acești autori cred că în compoziția granulelor metacromatice ale celulelor „Mast“ intră un polimer al acidului sulfuric ca și în compoziția heparinei și că datorită acestei asemănări chimice, anumite substanțe care precipită heparina vor avea aceeași acțiune asupra substanței metacromatice, fixând-o în așa mod încât nu se va mai dizolva dacă ulterior o vom colora cu culori bazice de anilină în soluție alcoolică. Acest lucru voi căuta să-l demonstrez în cele ce vor urma, arătând pe de o parte tehnica utilizată de Holmgren, precum și modificările făcute de noi, urmărind aceiași problemă.

Important este însă că aceste granulațiuni în mod normal sunt solubile în apă. Această solubilitate nu este la fel la toate speciile; la unele animale (șobolanul și șoarecele) nu este prea evidentă, pe când la altele (iepurele de casă) este deajuns ca fixatorul sau colorantul apos să acționeze cât de puțin pentru ca să se ajungă la dispariția completă a granulațiunilor. Din această cauză numai atunci se puteau menține dacă erau fixate în alcool concentrat și dacă în tratamentele ulterioare și în colorare nu se întrebunțau soluții alcoolice mai slabe de 70%. — Și metodele de incluziune obișnuite, înainte de toate incluziunea în parafină, erau de înlăturat, deoarece aduceau mari prejudicii acestor granule.

În celulele vii, granulațiunile nu apar clar din cauza indicelui lor de refracție coborât. La o colorare vitală cu roșu neutru, ne atrag imediat atenția prin colorarea lor în galben-roșu. Granulațiunile sunt rotunde, de mărime aproape egală și umplu în mod regulat corpul celulei. În mastocitele mari și ramificate ale Urodelelor apar în șiruri formate din grupuri mici, întrerupte, până la capătul celor mai fine expansiuni. În interiorul celulelor, numai nucleul și centrul celulelor, de lângă nucleu, rămân ca spații luminoase, libere.

Lehner descrie în mastocitele vii pete și fășii fără granulațiuni, care își schimbă încet forma, fiind considerate de el ca niște văi de scurgere pentru granulațiunile dizolvate.

Această dispoziție intracelulară se observă și în preparatele fixate și bine colorate. Granulațiunile apar în cele mai multe cazuri regulat rotunde, de mărime aproape egală, mai întunecate sau luminoase, dar totdeauna întens colorate, pe când citoplasma dintre ele rămâne în întregime necolorată. Mărimea lor variază foarte mult cu specia animală. Așa spre exemplu, la șobolan și șoarece, granulațiile sunt mari; la om și în special la pisică, se găsesc mastocite cu granulațiuni fine. Diferențele în mărimea granulațiunilor pot depinde între altele și de regiunea corpului unde se găsesc, sau de vârsta celulei respective. În consecință pot apărea la unul și același animal, în zone anumite, mastocite cu granule fine și mari.

Lehner susține că granulele din aceeași celulă nu au mărime egală.

Distrugerea parțială a granulațiilor se evidențiază prin conglomerări, prin cavități sau formațiuni inelare, prin colorarea metacromatică a citoplasmei intergranulare.

În afară de granulațiile specifice nu se mai găsesc în mastocite alte incluziuni. Numai în cazuri patologice, în mastocitele din jurul unor inflamații cronice, s'ar găsi, după Ciaccio (1913), grăsimi și lipoide.

Maierowski și alții (1908), a făcut cercetări în legătură cu prezența incluziunilor de pigment în mastocitele pielei de om. Însă nici rezultatul acestor cercetări și nici teoria care susține legătura genetică dintre mastocite și celule pigmentare nu au fost dovedite.

Mastocitele sunt sensibile nu numai la influențe chimice, ci și la cele mecanice pure. În această privință s'au făcut, din partea multor cercetători, numeroase referate și s'a ajuns la concluzia că așa zisele „Klasmatoze“, care indică dispariția granulațiilor din mastocite, în cele mai multe cazuri, sunt datorite distrugerii artificiale a corpului celular mastocitar la o preparare neatență cu dilacerarea țesutului.

Mastocitele însă nu sunt elemente fixe. Lehner (1924) apoi Brack (1925), au ajuns la această concluzie pe baza existenței formelor neregulate de celule în preparatele fixate, deci pe cale indirectă. Totuși, în majoritatea cazurilor nu s'au putut observa, în mod sigur, mișcări, la mastocitele animalelor cu sânge cald și rece, afară de deplasările intracelulare ale granulațiilor pe care le-am amintit mai înainte.

Samsonow (1908), Weil (1920), Lehner (1924), susțin că mastocitele sunt dotate cu proprietăți amiboide și cu posibilități de schimbare a formei, pentru că le găsim în mare număr infiltrate în epiteliul mucoasei intestinului gros. Istogeneza lor embrionară ne dovedește că aparțin marelui grup al celulelor migratorii. În împrejurări fiziologice, majoritatea se găsesc însă sub formă imobilizată.

Unii cercetători (Pappenheim 1905—1912), au crezut

că mastocitele ar reprezenta celule degenerate, însă presupunerea lor nu a fost întărită prin fapte. Cu toate acestea, după cum arată Lehner, apar uneori în țesutul conjunctiv mastocite degenerate, cu nucleu picnotic și granulațiunile în parte confluențe, în parte dizolvate. În special fenomenele de degenerescență ar fi exprimate în mastocitele invadate în epitelul intestinului gros.

Mastocitele trebuiesc considerate ca elemente celulare vitale supradiferențiate.

Ele au în organismul adult o viață limitată, având posibilitatea unei regenerări. În legătură cu aceasta stau raporturile pe care le au cu leucocitele granulare bazofile, așa numitele „Mastocite sanghine“.

La mamifere, mastocitele țesutului conjunctiv și leucocitele bazofile din sânge, sunt elemente independente din punct de vedere al originii, apropiate însă numai prin proprietățile granulelor.

Din contră, la vertebratele inferioare este o relație destul de strânsă între cele două tipuri de celule. Leucocitele bazofile care au emigrat din sânge în țesutul conjunctiv, se desvoltă în mod progresiv, se imobilizează, se măresc, trimit prelungiri și la sfârșit dobândesc proprietăți definitive de mastocite ale țesutului conjunctiv (Maximov).

Solucha și mai nou Mjassojedoff (1926), au confirmat la pasări, iar Eberhardt la reptile, transformarea „Mastocitelor sanghine“ emigrate din țesuturi în mastocite ale țesutului conjunctiv.

În ceea ce privește regenerarea lor, Maximov (1906), a găsit, în mastocitele mamiferelor adulte, figuri mitotice. Cu toate că sunt rare, este dată astfel pentru aceste celule posibilitatea unei regenerări omoplastice, adică prin diviziune mitotică proprie. Mai nou Lehner (1923) crede că ar fi vorba de o diviziune amitotică în plus (în mezenterul de șobolani). În afară de regenerarea omoplastică a mastocitelor mature, bogate în granulațiuni, mulți autori admit și o regenerare eteroplastică a lor, în special în țesutul limfoid. Ar însemna că mastocitele se pot regenera din celule neregranulare, prin

formarea în interiorul citoplasmei a granațiilor specifice. Kanthak, Hardy (1894—1895) și Jolly (1899—1900), au văzut acest fenomen în lichidul peritoneal al șobolanului, iar Samsonow (1908) în tunica proprie a mucoasei intestinului. Downey (1911) a descris în ganglionii limfatici ai pisicii dezvoltarea mastocitelor prin apariția granulelor metacromatice în limfocite și plasmocite. La cobaii adulți, acest autor găsește nașterea eteroplastică a mastocitelor și în țesutul conjunctiv lax, unde granulele s'ar dezvolta în citoplasma celulelor migratorii imobilizate, prin participarea activă a nucleului. Weill (1919) și Staemmler susțin încă posibilitatea dezvoltării mastocitelor din celulele agranulare. Lehner (1924) descrie o regenerare activă eteroplastică a mastocitelor din limfocite mici (timocite), în timpul involuției timusului cornutelor mari și din limfocite sau plasmocite în mucoasa intestinală. Și la vertebratele inferioare mastocitele au tot o înmulțire omoplastică, prin mitoză (Maximov, Michels și Eberhardt). Dacă și amitoza joacă rol, rămâne de văzut. Granațiile mastocitelor tinere se deosebesc adesea prin proprietățile lor față de materiile colorante, de granațiile celulelor adulte.

b) Clasmatocitele au fost descrise de Ranvier la 1890, în țesutul conjunctiv la batracieni (Triton, Salamandră, Axolot). Sunt celule cu o formă neregulată, cu o mulțime de prelungiri foarte mari, monoliforme, care au proprietatea de a se fragmenta. În citoplasma lor se găsesc granațiuni care se colorează în roșu cu ajutorul coloranților de anilină, bazici, regresivi (toluidină și tionină), la fel ca și granațiile mastocitelor lui Ehrlich. Aceste celule sunt răspândite pretutindeni în țesutul conjunctiv, mai ales în membrane unde ele ating o dimensiune considerabilă. Pe lângă această formă arborizată se mai găsesc și forme masive, mici, ale căror granațiuni prezintă aceleaș caractere. Forma arborescentă a clasmatocitelor la batracieni nu este, prin urmare, decât un aspect sub care se prezintă celulele „Mastzellen“ ale lui Ehrlich în țesutul conjunctiv al acestor vertebrate.

Fiziologia mastocitelor și clasmatocitelor.

(cu considerațiuni de istopatologie)

Despre importanța funcțională nu se poate spune ceva precis, din cauza nesiguranței care a domnit în privința compoziției chimice a granulelor.

Activitatea lor fagocitară este neînsemnată. Presupunerea că granulațiile ar fi materii hrănitoare digerate a determinat pe Ehrlich să le dea numele de „Mastzellen“. Această presupunere se găsește în literatura mai nouă relativ la fiziologia lor (Michels), însă nu poate fi susținut prin fapte demne de încredere.

Ca la toate celulele, granulațiile fiind elaborate de citoplasmă, ar putea fi luată în considerare și o activitate secretorie.

În orice caz, împrăștierea granulelor în celule, umflarea lor, formarea de vacuole și înainte de toate așa numitele spații metacromatice care înconjoară adesea celulele în preparatele fixate și colorate, trebuie considerate ca artefacte.

Împrăștierea mastocitelor în țesuturi și în special infiltrarea lor în formațiunile limfoide intestinale, ar pleda încă pentru funcția secretorie (Lehner).

Mai departe, se poate observa pe limba de broască infiltrarea a numeroase mastocite în endoteliul vaselor limfatice. Corpul celular proeminând în lumenul acestor vase, se pare că aruncă granulațiile în limfă pentru a îndeplini un oarecare rol fiziologic. În tot cazul, pentru ca substanța granulară să poată părăsi citoplasma, trebuie să ia o anumită formă ce nu poate fi stabilită prin colorare.

Unna și Golodetz (1913), văd în granulațiile mastocitelor purtătorii unei peroxidaze.

În fine, după cum am mai amintit, Holmgren și Wilander stabilind compoziția chimică a granulelor (un polyester al acidului sulfuric), compoziție identică cu a heparinei, cred că totalitatea mastocitelor constituie locul de producere al heparinei în organism, având deci rolul unei glande cu secreție internă (Teoria endocrină).

Mastocitele se găsesc în abundență în carcinome și mai ales în „Urticaria pigmentară“, formându-i, acestea din urmă, caracterul fundamental. În această afecțiune mastocitele se prezintă sub formă de celule mari, ovale, rotunde, adesea fuziforme cu nucleul central și cu granulațiile caracteristice în citoplasmă. Uneori ele au o formă tumorală, sunt foarte numeroase, se presează reciproc, luând naștere forme poliedrice, iar din țesutul preexistent numai rămânând nimic. Când sunt mai puțin numeroase se dispun dealungul capilarelor dilatate. În acest caz găsim fascicule colagene între masele de infiltrație celulară. Le găsim uneori infiltrate și în regiunea glandelor sudoripare însă de preferință în stratul cuticular mijlociu. Ar fi vorba, după unii, de o malformațiune congenitală.

Maximov (1904), arată că în inflamațiile acute se distrug mastocitele și granulațiunile lor, fiind fagocitate de poliblaste.

Metodele vechi și metoda lui Holmgren pentru punerea în evidență a granulelor mastocitelor și clasmatocitelor.

a) S'au făcut nenumărate cercetări pentru a pune în evidență metacromazia care deosebete aceste celule de restul celulelor țesutului conjunctiv. Numărul lor, este mărturia cea mai fidelă a rezultatelor nesigure pe care le dau. Fixatorii recomandați sunt variați, după fiecare autor. Dintre aceste metode s'au impus mai mult, până la apariția cercetărilor lui Holmgren, metodele lui Unna. El recomandă să se facă fixarea cu alcool absolut ca fiind cea mai bună. Mai puțin indicat este alcoolul de 95%, sau 2 părți alcool 95% și o parte formol (Schäffer). La fel, amestecul lui Helly sau Orth, precum și fixarea cu formol, nu sunt recomandabile. Voi enumăra câteva din metodele întrebuițate până acum, care încearcă să evidențieze metacromazia granulațiilor mastocitelor.

I. Metodele lui Unna :

Colorarea cu albastru de metilen policrom.

1. Fixarea în alcool absolut. Se poate utiliza și formol sau amestecul lui Orth. (cu rezultat slab). Includerea în celoidină, parafină, eventual prin congelare. Deparafinarea, la secțiunile la celoidină, îndepărtarea celoidinei. Secțiunile se trec apoi în apă distilată timp de 1—5 minute.

2. Colorarea cu albastru de metilen policrom a lui Unna, timp de aproximativ 10 minute.

3. Spălare cu apă distilată câteva minute.

4. Diferențiere în amestecul de ether-glicerină al lui Unna (mai bună este soluția firmei Grüber, diluată cu apă distilată) timp de 1— la mai multe minute, până ce secțiunea ia o culoare albastră deschisă.

5. Spălarea în apă mai multe minute (1—10).

6. Deshidratarea scurtă în alcool absolut. Xilol. Balsam (neutru).

Granulele mastocitelor apar colorate în roșu meta-cromatic, nucleul, granulațiile plasmocitelor, se colorează în albastru închis, protoplasma plasmocitelor în albastru, mușculul și amiloidul în roșu.

Colorarea cu albastru policrom + orceină.

1. Fixare în alcool absolut. Includere în parafină sau celoidină.

2. Deparafinare, deceloidizare. Trecerea secțiunilor în apă.

3. Colorare cu albastru de metilen policrom, 10 minute.

4. Spălare ușoară cu apă.

5. Sugativare cu hârtie de filtru pentru îndepărtarea apei.

6. Trecerea în soluția următoare : orceină 1 gr + alcool 100 cc., timp de 15 minute.

7. Alcool absolut. Oleu de Bergamot. Balsam.

Granulațiile mastocitelor se colorează în roșu ca ci-reșa, protoplasma fibrelor musculare în albastru.

II. Metoda lui Ehrlich pentru mastocite.

1. Fixarea în alcool absolut. Includere, secționare.
2. Colorarea în soluție apoasă concentrată de violet de Dahlia.
3. Spălare cu apă.
4. Deshidratare în alcool absolut. Xilol. Balsam.

Granulațiile mastocitelor se colorează în roșu metacromatic, nucleii rămân necolorați, restul țesutului foarte slab colorat.

III. Holländer, după fixare în Zenker sau formol sublimat, colorează timp de 15 minute cu soluție diluată de albastru policrom. Spală apoi în apă, trece în acid acetic 2%, 2—3 minute, spală din nou cu apă, sugativează cu hârtie de filtru. Alcool. Xilol. Balsam. Granulele apar colorate în roșu, nucleii în albastru, nucleolii slab violet.

IV. Maximow (1906) fixează în alcool absolut, colorează 1—2 zile în soluție de alcool 5—10%, saturată cu tinină. Granulațiile apar roșu violet.

Toate metodele, care utilizează ca fixatori soluții alcoolice, sunt relativ bune. Metacromazia apare, după colorarea cu coloranții bazici de toluidină, în condițiuni multumitoare. Alcoolul însă pătrunde foarte greu, produce o contracție a elementelor alterând structura proprie a organelor. Din această cauză elementele nu se pot colora prea bine după alcool și în câmpul microscopic vom găsi diferite alterațiuni și retracțiuni, care în mod normal nu se găsesc. Ceilalți fixatori simpli sau în amestecuri (formol, formolsublimat, Zenker, Helly, Maximow), dau rezultate slabe. După fixarea în formol se obține o metacromazie neînsemnată, granulele se dizolvă și substanța metacromatică difuzează la periferie, formând câmpuri metacromatice.

Cercetătorii din ultimul timp au căutat să găsească o altă deslegare acestei probleme. Trebuia cunoscută mai întâi constituția chimică a granulelor și după aceea să fie găsit un fixator pe baza proprieților care rezultă din această constituție. Fixarea trebuie deci să se bazeze pe considerente științifice.

b) Metoda lui Holmgren.

Acest autor fixează mastocitele bazându-se, în parte, pe cercelările făcute împreună cu Wilander asupra chimiei granulelor și în parte pe cercelările lui Jorpes, Howel, asupra acelor substanțe care, în vitro, precipită heparina. Conform acestor rezultate, el a fixat mici bucăți de organe și țesuturi timp de 12—24 ore în soluție bazică de acetat de plumb 4%, proaspăt preparată. Se poate recurge la acetat de plumb nativ sau la Liquor plumbi subacetic al firmei Kalbaum. În timpul fixării flaconul cu preparatul trebuie bine închis pentru a împiedeca precipitarea prea repede a acetatului de plumb. Chiar dacă luăm toate precauțiunile, se formează cristale în preparat, care impietează asupra imaginilor istologice. Acest fixator înlătură formarea zonelor metacromatice descrise de Arnold și Unna, interpretate de ei ca un fenomen de secreție, și care, în realitate, erau datorite agenților fixatori, cari provoacă fenomenul de spălare a granulelor. Într'o primă fază, înainte de a apărea aceste zone, se poate observa cum granulele celulare difuzează în întreaga citoplasmă și numai în faza doua a acestei alterații granulare apar acele zone.

După fixare cu acetat bazic de Pb. și spălare cu apă distilată, se pune preparatul în alcool 60%, iar după deshidratare și includere în parafină se procedează obișnuit. Materialul se recoltează dela om, porc câine, cobai, iepure, salamandă, întrebuițând organe în țesutul conjunctiv al cărora se găsesc cu predilecție „Mastzellen“ (ficat, plămân, intestin, piele, rinichiu, suprarenală, etc.).

Afară de aceasta, o serie de preparate au fost fixate în acetat bazic de Pb. și apoi spălate 24 ore cu apă, înainte de a fi deshidratate și incluse; o altă serie, după aceeași fixare, au fost tratate 24 ore cu soluție neutră de formalină 10%, după care a urmat deshidratarea și includerea în parafină.

Pentru a vedea cum se comportă mastocitele față de alți fixatori cari precipită heparina, autorul a întrebuițat organe de vacă, porc, iepure, câine. Granulațiile mastocitelor dela vacă sunt foarte rezistente la apă, ale iepurelui în contact

cu apa imediat se dizolvă, iar granulele porcului au comportare intermediară. Substanțele care precipită heparina, dar care nu dau rezultate așa de frumoase ca acetatul sunt: chinina hidroclorică în soluție apoasă de 4%, precum și în soluții alcoolice de 25, 12.5 și 5%, apoi soluția apoasă concentrată de hidroxid de bariu, clorură de bariu. Durata fixării și tratamentul ulterior sunt la fel ca la fixarea cu acetat de Pb.

Fixarea cu alcool-formol a dat rezultate slabe. De asemenea a făcut fixări în formalină neutră de 10%, cu alcoolizare imediată; o serie de organe au fost prelucrate în așa fel, încât, după fixarea în formol, preparatele au fost spălate 24 ore cu apă, iar altă serie a fost fixată în formol-sublimat, timp de 12 ore (după Häggquist). Toate preparatele, după fixare, au fost incluse în parafină.

Colorarea. După includerea în parafină secțiunile au fost colorate pe de o parte cu albastru de toluidină în soluție apoasă 1%, pe de altă parte în soluția alcoolică a acestei substanțe colorante. (1 gr. albastru de toluidină dizolvat în 99 cc. alcool 60%). Holmgren a observat că în primul caz se colorează atât mastocitele cât și țesuturile din jur, pe când în ultimul caz mastocitele se evidențiază clar din restul țesuturilor mai slab colorate. Colorarea cu soluția alcoolică de albastru de toluidină este mult mai electivă decât cea cu soluție apoasă, care are desavantagiul că evidențiază și unele substanțe cromotrope, ce se găsesc în preparat. În cazul albastrului de toluidină în soluție alcoolică, nu vedem nimic sau numai urme din substanța cromotropă, în timp ce granulele mastocitelor apar evident.

Diferența chimică dintre granulele mastocitelor și substanța cromotropă, care se găsește în abundență în aortă, cordonul ombilical etc., se datorește gradului de esterificare al hidraților de carbon cu moleculă mare. La primele e vorba de un polyester al acidului sulfuric, iar în ultimul caz de un acid sulfuric esteric mai puțin esterificat (Levene).

Metacromazia care apare în aceste cazuri la colorarea cu albastru de toluidină, se explică, după cum reiese din

lucrarea lui Lison, prin acțiunea acidului sulfuric esteric cu moleculă mare. La colorarea cu soluția alcoolică de albastru de toluidină, granulele mastocitelor se colorează tot așa ca și cu soluția apoasă, în timp ce substanța cromotropă ia numai o slabă nuanță roșie. Dacă întrebuițăm colorantul în soluție alcoolică de 70—80%, substanța cromotropă rămâne necolorată. Astfel avem posibilitatea, ca pe cale istologică să diferențiem acizii mucoitin sau condroitin-sulfuric. Rezultatele obținute după aplicarea fixării pe baze științifice, au fost, în adevăr, foarte mulțumitoare, după cum arată autorul.

A întrebuițat prima oară organe dela om, embrion de om, de vacă, pe care le-a fixat în acetat bazic de Pb. 4% și apoi le-a tratat cu alcool. Mastocitele organelor întrebuițate (ficat, plămân, intestin, rinichiu, piele, splină) sunt de regulă bogate în granule celulare, bine evidențiable, bine fixate și arată o bună metacromazie. Imagini care să vorbească de o distrugere a granulelor celulare nu s'au văzut. Aceleaș organe fixate în acetat bazic de Pb. și spălate apoi cu apă 24 ore, prind mai greu colorarea cu albastru de toluidină în comparație cu tratamentul anterior. Totuși mastocitele se disting ușor și conțin granule bine fixate.

Fixarea în acetat bazic de plumb apoi tratarea cu formol neutru 10%, a arătat celule cu granulele bine fixate, distincte, însă colorarea țesuturilor a fost evident mult mai slabă.

La fixarea în formol neutru 10%, după care a urmat deshidratarea cu alcool, granulele au fost distruse, au suferit fenomenul de spălare. Fixarea în formol neutru 10% urmată de spălarea cu apă 24 ore, a arătat „Mastzellen“ fixate foarte rău, numai câteva celule și-au păstrat granulele. În jurul celulelor se observă o bandă metacromatică. Țesutul în care sunt așezate mastocitele este, de regulă, bine colorat.

Fixând în formol-sublimat și spălând apoi cu apă 24 ore, totdeauna granulele mastocitelor se mențin rău. Ele se distrug prin dizolvare în parte în citoplasmă, în parte sunt

spălate din celule. Într'o parte a celulelor se mențin câteva granule. Colorabilitatea restului țesutului este bună.

La porc. 1. Fixarea cu acetat bazic de Pb., urmată de deshidratarea cu alcool arată „Mastzellen“ în toate organele examinate (ficat, plămân, rinichiu, splină), bine fixate, granulele păstrate, având o metacromazie pronunțată.

2. Intrebuițând acelaș fixator și spălând apoi cu apă 24 ore, se obțin celule bine fixate, metacromazie bună. În unele organe, în special la plămâni, apar, la colorația cu soluția apoasă, halouri metacromatice.

3 Fixarea cu acetat bazic de Pb. 40% și tratarea cu formol neutru timp de 24 ore, dă posibilitatea evidențierii destul de bună a mastocitelor. La o parte a organelor se găsesc semne multe de spălare a granulelor. Însă dacă întrebuițăm colorantul în soluția alcoolică, înlăturăm și acest inconvenient.

4. Fixarea cu formol neutru urmată de deshidratarea cu alcool; fixarea cu formalină neutră 10% și spălarea 24 ore cu apă, fixarea cu formol-sublimat și spălarea ulterioară cu apă, au dat rezultate mult inferioare. Mastocitele și granulele sunt rău fixate. În partea granulele confluează sau se așează în citoplasmă în formă de cordoane neregulate și netede, în parte sunt debazefiate și constituie halouri metacromatice.

La câine. 1. Fixarea cu acetat bazic de Pb. 40% urmată de deshidratarea cu alcool, arată mastocite cu granule bine fixate, care se evidențiază din din citoplasmă ca formațiuni perfect circumscrise, cu o metacromazie bună.

2. Dacă după aceiaș fixare, urmeză spălarea cu apă 24 ore, se observă menținerea granulelor. Totuși, uneori, în jurul celulelor apar zone metacromatice, care sunt semnul unei spălări a granulelor. Alte ori se poate observa la granule o fărâmițare incipientă.

3. Dacă după fixarea cu acetat bazic de Pb. se tratează organele cu formol neutru 10%, granulele se păstrează în cele mai multe organe. Tendința de confluare se observă numai în plămâni sau ovar,

4. Fixarea în formol neutru 10% urmată de deshidratare cu alcool, fixarea în formol neutru cu spălarea după aceea în apă 24 ore, fixarea în formol-sublimat cu deshidratare în alcool, arată distrugerea granulelor din mastocite. Acestea sunt spălate din celule sau difuzează în ele dând citoplasmei o culoare roză deschisă. Numai granulele din mastocitele ovarului și pie'ei se păstrează ceva mai bine.

La cobai. Lucrând cu următoarele organe: ficat, plămân, rinichiu, splină, piele, ovar și fixându-le în acelaș mod, se observă că, după acetatul bazic de Pb., oricum am trata piesele ulterior (cu alcool, apă, formol), granulele sunt bine fixate, iar colorarea cu albastru de toluidină în soluție apoasă sau alcoolică nu modifică aspectul. Fixarea în formol neutru 10% urmată de deshidratare sau de spălare cu apă, are ca efect distrugerea completă a granulelor. Acelaș efect îl are și fixarea cu formol sublimat.

La iepure. Autorul nu s'a mulțumit numai să fixeze organele așa cum se găsesc ci a injectat animalul cu heparină, pentru a confirma pe de o parte modul de comportare asemănător între granulele de heparină și granulele mastocitelor, pe de altă parte pentru a demonstra experiențele făcute de Wilander referitor la prezența heparinei în căile de eliminare ale rinichiului. A supus, pentru acest lucru, organele la diferite moduri de fixare.

1. La fixarea cu acetat bazic de Pb. urmată de deshidratare cu alcool sau de spălare cu apă timp de 24 ore, comportamentul mastocitelor și al celulelor care înglobează granulele de heparină din diferitele organe (ficat, plămân, splină, rinichiu, intestin), este asemănător. Mastocitele sunt bine fixate. Nu se găsesc formațiuni care să pledeze pentru o distrugere a granulelor. În parenchimul renal, în celulele fagocitare ale plămânului și splinei, în endoteliul vascular din intestin și splină, precum și în celulele lui Kupfer, se văd granule metacromatice. Acestea, deoarece în stare normală nu se găsesc, trebuie să reprezinte heparina injectată și rezorbită sau fagocitată din sânge. Granulele de heparină în rinichiu sunt un stadiu premergător excreției.

2. La fixarea cu acetat bazic de Pb. 4% urmată de tratarea cu formol neutru timp de 24 ore, lucrurile se schimbă puțin. Granulele de heparină se mențin bine, însă în mastocitele pielei se găsesc câteva imagini care pledează pentru o spălare a granulelor.

3. Fixarea cu formol 10% urmată de deshidratare cu alcool sau de spălare timp de 24 ore cu apă și fixarea cu formol-sublimat, dau rezultate tot mai slabe. Nu se mai evidențiază nici granulele mastocitelor, nici cele de heparină.

Deasemenea autorul a fixat organe (ficat, plămân, piele, intestin) dela vertebrele inferioare (Salamandra maculosa, Aligator mississippiensis) în acetat bazic de Pb. Mastocitele din aceste organe au prezentat granule bine fixate.

Că acțiunea acetatului de Pb. asupra granulelor mastocitelor nu e un fenomen întâmplător, o arată clar fixarea acestora cu alte substanțe care precipită heparină. Așa de ex., fixând organe (ficat, plămân, intestin), dela vacă, porc, câine, iepure, în soluție concentrată de hidroxid de bariu și tratând ulterior cu alcool, sau întrebuintând soluția concentrată apoasă de clorură de bariu timp de 24 ore cu spălare cu alcool, sau soluția apoasă concentrată de chinină clorhidrică în acelaș mod, vom obține în „Mastzellen“ granule, în parte, bine fixate. Totuși majoritatea acestor celule sunt înconjurate de zone metacromatice. La aceste metode de fixare se obține numai o precipitare parțială a granulelor. Se fixează relativ bine granulele dela câine, mai rău ale porcului și iepurelui.

Cu metoda lui Holmgren s'a stabilit importanța fixării granulelor „Mast“ cu acetat bazic de Pb. Colorația se face, după cum am spus, cu albastru de toluidină 1% în apă sau alcool 60%. Acest colorant dă, după Lison, cu acidul sulfuric polyeșter, o reacție metacromatică absolut specifică. Chiar și granulele „Mast.“ iepurelui rezistă la apă după fixarea cu acetat bazic de Pb. Cu fixatorii ceilalți se obțin rezultate mediocre, afară de alcool, care fixează mai bine granulele, însă prezintă anumite desavantajii.

Dacă la anumite animale se obțin imagini frumoase

de granule chiar pe lângă o fixare nepotrivită, acest fenomen se explică prin rezistența mare a granulelor (la șoa-reci, de ex.). Probabil că această rezistență să fie în raport cu gradul de esterificare al granulelor.

Fără de nesiguranța și insuficiența celorlalți fixatori în ce privește fixarea granulelor, metoda inaugurată de Holmgren, cu acetat bazic de Pb., aduce o contribuție însemnată în acest domeniu, mai ales că se sprijină pe baze științifice. Din cauza efectului asemănător pe care îl are acetatul de plumb asupra heparinei și asupra granulelor mastocitelor, ajunge la concluzia că trebuie să existe o identitate și în constituția chimică a lor. Totuși acetatul bazic de Pb. dă precipitate în preparat, care cu greu se pot înlătura, aducând prin aceasta o piedecă serioasă examinării secțiunilor microscopice.

Cercetări personale.

Pe lângă repetarea colorării după metodele clasice, având ca fixator alcoolul absolut, am făcut preparațiuni după tehnica nouă introdusă de Holmgren. La sugestia Domnului Profesor Ioan Drăgoiu, am utilizat pentru fixare acetat bazic de Pb. în alcool 96% (soluție saturată) și acetat bazic în soluție apoasă 4%. Organele le-am recoltat dela vițel și vacă, luând pe acelea cu care a lucrat autorul (ficat, plămân, rinichi, splină, piele, intestin). Am făcut 6 serii pentru a vedea dacă nu există vreo diferență între modul de colorare al mastocitelor după fixarea în soluția alcoolică sau apoasă de acetat bazic de Pb. Am fixat totodată în aceste soluții mezențier de broască, pentru a vedea modul de comportare al clasmastocitelor, care nu sunt, după cum știm, decât reprezentantele mastocitelor lui Ehrlich la vertebrele inferioare.

Seria I. Fixarea. Soluție saturată de acetat bazic de Pb. în alcool, timp de 24 ore.

Colorarea. Albastru de toluidină în soluție apoasă (1%).

Rezultat. Granulele mastocitelor mulțumitor fixate, prezintă metacromazie bună. Nu se vede nici un semn de distrugere a granulelor.

Seria II. Fixarea. Acetat bazic de plumb 4⁰/₀.

Colorarea. Albastru de toluidină în soluție apoasă.

Rezultatul ceva mai bun Granulele bine fixate, atât la mastocite (mai ales în derma pielei, intestin, ficat), cât și în clasmatocitele batracinelor. Granulele ocupă tot corpul celular în mod uniform, deasemenea și prelungirile clasmatocitelor, arătând în toate locurile o metacromazie evidentă. Singurul desavantajiu îl formează precipitatele de plumb de pe preparat.

Seria III. Fixarea. Acetat bazic de plumb 4⁰/₀.

Colorarea. Albastru de toluidină în soluție alcoolică 1⁰/₀.

Rezultatul: ca și la seria I.

Seria IV. Fixarea. Alcool absolut.

Colorarea. Albastru de toluidină în soluție apoasă.

Rezultat. Granulele fixate mulțumitor. Metacromazia ceva mai slabă.

Seria V. Fixarea. Alcool absolut.

Colorarea. Albastru de toluidină în soluție alcoolică.

Pe lângă inconvenientele date de alcool, granulele sunt mulțumitor fixate.

Seria VI. Fixarea. Soluție saturată de acetat bazic de Pb. în alcool 96⁰/₀.

Colorarea. Albastru de toluidină în soluție alcoolică 1⁰/₀.

Rezultat. Granulele mastocitelor bine fixate, arată peste tot o metacromazie bună. Acelaș lucru se observă la clasmatocite.

Timpu de colorare optim este dela 2—4 ore. Cele mai bune rezultate le-am obținut când după fixare cu acetat ba-

zic de Pb. în soluție apoasă 4⁰/₀, am colorat cu albastru de toluidină în soluție apoasă. La fel, dacă după fixarea cu soluție saturată de acetat de Pb. în alcool, am colorat cu soluția alcoolică a colorantului. În acest caz, însă, metacromazia este cu ceva mai slabă. Deasemenea, după fixarea cu acetat bazic de plumb metacromazia se menține multă vreme, chiar mai multe luni. Blocurile de parafină se secționează foarte bine după acest fixator.



Concluziuni.

1. Fixarea și colorarea granulațiilor celulelor mastocite din țesutul conjunctiv, trebuie să se bazeze pe cunoașterea constituției chimice a granulelor și a proprietăților care rezultă din această constituție.

2. Metodele care fixează în soluții alcoolice sunt bune, însă alcoolul prezintă dezavantajul că pătrunde foarte greu, produce o contracție a elementelor și împiedică o mai bună colorare.

3. Ceilalți fixatori simpli sau în amestecuri (formol, formol-sublimat, Zenker, Helly) dau rezultate slabe.

4. Metoda lui Holmgren, care bazează fixarea pe proprietatea ce o are acetatul bazic de plumb de a precipita heparina, substanță cu aceeași constituție chimică ca și granulele mastocitelor, aduce o inovație în acest domeniu, înlăturând, în cea mai mare parte, inconveniente pe care le prezintă celelalte metode.

5. Fixarea cu acetat bazic de plumb dă însă precipitate pe preparat, care cu greu se pot înlătura.

6. După fixarea cu acetat bazic de plumb în soluția alcoolică, convine mai mult soluția alcoolică a colorantului.

7. După fixarea cu acetat bazic de plumb în soluția apoasă, colorația cu soluție apoasă de albastru de toluidină se face în condițiuni optime.

8. Aceleași fenomene se observă și la clasmatocitele batracienelor, care nu sunt decât reprezentanțele mastocitelor la vertebratele inferioare.

Cluj, la 4 Noembrie 1939.

Văzută și bună de imprimat.

Decanul Facultății de medicină:
s. s. DRĂGOIU

Președintele tezei:
s. s. DRĂGOIU

Bibliografie.

1. *Darier (J.)* — Précis de Dermatologie.
 2. *Dragoiu (I.)* — Elemente de Istologie și tehnică microscopică.
 3. *Holmgren (Hy.)* — Eine neue Methode zur Fixierung der Ehrlichen Mastzellen. Mit besonderer Berücksichtigung der Chemie der Zellgranulla. — Zeitschrift für Wissenschaftliche und für Mikroskopische Technik. — p. 419. Band. 55. Heft. 4.
 4. *Herxheimer.* — Technik der Pathologisch-Histologischen Untersuchung. Methoden zur Darstellung der Granula der Plasma und Mastzellen.
 5. *Hoepke (H.)* — Histologische Technik der Haut. Darstellung der Mastzellen.
 6. *Kyrle (J.)* Histo-biologie der Menschlichen Haut und ihrer Erkrankungen. Erster Band.
 7. *Maximow (A.)* — A Text-Book of Histology. The connective tissue proper.
 8. *Möllendorf.* Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. Die Gewebe. Erster Teil.
 9. *Romeis.* — Taschenbuch der Mikroskopischen Technik.
 10. *Schmorr (Gy.)* — Die Patologisch-Histologischen Untersuchungsmethoden.
-