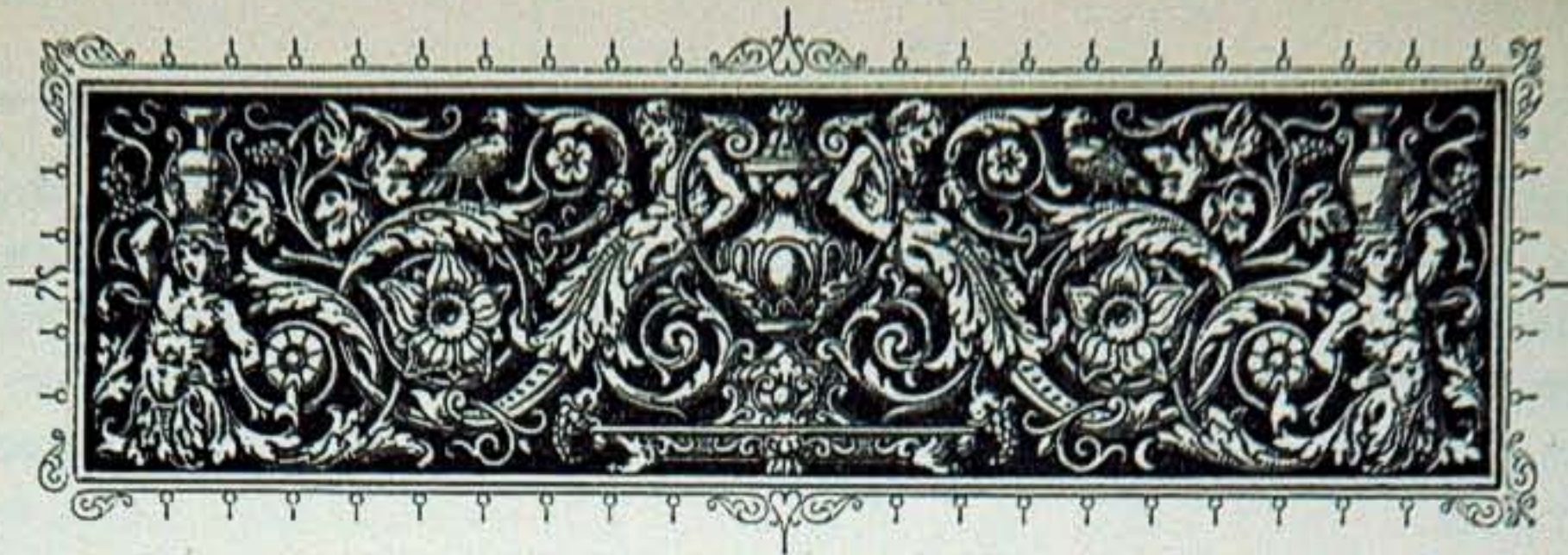


O barwieniu ośrodków nerwowych
przy pomocy zaprawy (bejcowania) solami metali ciężkich

NAPISAŁ

HENRYK KADYI.





Dwa względy skłaniają mię do ogłoszenia wyników doświadczeń moich nad barwieniem ośrodków nerwowych.

Przedewszystkiem sędzę, że powiodło mi się znaleźć sposób badania ośrodków nerwowych, który pozwala uwidocznic rozmaite ich składniki histologiczne, a który, jak każda zdobycz w dziedzinie techniki anatomicznej musi prowadzić do rozszerzenia naszej wiedzy. Sam zaś przedmiot badania, niezmiernie ważny a nader zawiły i trudny, usprawiedliwia przypuszczenie, że każde, choćby najmniejsze ulepszenie lub wzbogacenie techniki badania, będzie dla nauki pożądanem.

Drugą okolicznością, która skłania mię do ogłoszenia niniejszej pracy jest przekonanie, że moje doświadczenia objaśniają działanie zaprawy i barwików, że zatem są ważnym przyczynkiem do teoryi barwienia tkanek zwierzęcych i ich składników.

Do przedsięwzięcia doświadczeń nad barwieniem ośrodków nerwowych (mózgu i rdzenia) skłoniło mię pragnienie jak najwyraźniejszego uwidocznienia szarej istoty na preparatach zwykłych (nie mikroskopowych) używanych przy wykładach, oraz przeświadczenie o potrzebie dokładniejszego studyowania rozmieszczenia szarej i białej istoty w ośrodkach nerwowych.

Do takiej pracy zachęcają świetne wyniki, jakie daje ustalenie mózgu i rdzenia już w kilkuprocentowym roztworze aldehydu mrówkowego (formaldehydu¹⁾). Przypuszczałem, że ośrodkowe ustalone aldehydem mrówko-

¹⁾ Formalina i formol są, jak wiadomo 40% roztworami aldehydu mrówkowego w wodzie; przeto 1% roztwór aldehydu mrówkowego jest 2'5% roztworem formaliny (lub formolu) a 1% roztwór formolu (lub formaliny) jest 0'4% roztworem aldehydu mrówkowego.

wym a zachowane bądźto we wodzie (przekroplonej), bądź w płynach wodnistych, nie będąc traktowane wyskokiem a przez to przesiąknięte tłuszczowymi składnikami myelinu, które wyskok rozpuszcza, muszą być przenikliwe dla wodnych roztworów barwionych tak, że grube skrawki lub większe kawałki mózgu ustalonego w aldehydzie mrówkowym będzie można zabarwić na wskrós.

Przekonałem się, że tak jest istotnie. Już przeszło trzy lata temu za pomocą barwienia karminem borakowym lub karminem lithionowym i długiego (kilkutygodniowego) płukania w wysoku (60%) zakwaszonym kwasem solnym, powiodło mi się otrzymać większe kawałki mózgu zabarwione na wskrós, na których różnica między istotą szarą i białą była uwydatniona w taki sposób, iż z tego byłem zadowolony. Między innemi miałem na przeszło 1 ctm. gruby skrawek przeprowadzony przez cały mózg poziomo w wysokości wzgórków wzrokowych i ciał prążkowanych, oraz preparaty mózdzków, które w całości były karminem zabarwione a dopiero potem w rozmaitych kierunkach poprzecinane. Tymi, powszechnie znanymi sposobami barwienia karminowego otrzymuje się wyłączone zabarwienie jąder komórkowych, a różnica między szarą i białą istotą ośrodków nerwowych uwydatnia się żywszem zabarwieniem istoty szarej z tego powodu, że istota ta zawiera liczniejsze komórki (a więc i jądra), czyli gęściej obok siebie nagromadzone. Z tego powodu na takich preparatach uwydatniają się nawet mniej lub więcej wyraźnie różnice między rozmaitemi ogniskami szarej istoty lub jej częściami; n. p. bardzo wybitnie występuje różnica między obiema warstwami kory mózdzku, gdyż warstwa t. zw. ziarnista barwi się silniej niż powierzchowna warstwa molekularna. Za to inne części nie uwydatniają się tak, jakbyśmy sobie tego życzyli, n. p. ciało zębate mózdzku przedstawia się na takich preparatach bardzo mdło, niemal mniej wyraźnie, niż na niebarwionych preparatach mózdzku ustalonego w aldehydzie mrówkowym.

Prawie zupełnie zawiodły mnie nadzieje pokładane w tym sposobie barwienia, co do rdzenia pacierzowego. Przez zwykłe zabarwienie jądrowa szara istota rdzenia pacierzowego uwydatnia się w śród białej tylko słabo i mdło, zwłaszcza w cieńszych skrawkach. Spodziewałem się, że w grubych skrawkach rdzenia (n. p. 300 μ grubości) zabarwionych na wskrós karminem lithionowym (i odbarwionych zakwaszonym wyskokiem) przez sumowanie się efektu barwnego po rozjaśnieniu w balsamie kanadyjskim szara substancja wystąpi wybitniej. Tymczasem okazało się, że i na takich skrawkach szare słupy są wprawdzie ciemniej (silniej) zabarwione, lecz przecież mdłe, tak, że ich granic ani ostro nie widać, ani też na zdjęciach fotograficznych w sposób zadowalniający nie można otrzymać.

Daleko wybitniej niż na takich preparatach, różnica szarej i białej istoty występuje na preparatach ośrodków nerwowych, które wedle znanych prze-

pisów były ustalone w kwasie chromowym lub w płynach zawierających chromany (n. p. w płynie Müllera, w płynie Erlickiego), a następnie barwione karminem.

Jeżeli tego rodzaju preparaty należycie się udały, to w nich z wyjątkiem mylinowych osłonek włókien nerwowych, jak wiadomo, są zabarwione wszystkie histologiczne składniki ośrodków nerwowych, jedne silniej a inne słabiej; mianowicie barwią się nie tylko jądra komórkowe, lecz także i ciała komórek, barwią się komórki zwojowe i ich wypustki, barwią się niteczki osiowe włókien nerwowych, barwią się komórki pajęczynowate neuroglii, włókna neuroglii, i w ogóle neuroglia. Rozmaite te składniki rdzenia i mózgu można na takich preparatach rozróżnić tylko o tyle, o ile jedne się zabarwiły silniej, inne słabiej; różnica zaś między szarą i białą istotą uwydatnia się przez to, że w skład białej substancji wchodzi znaczna ilość myelinu, który pozostaje niezabarwiony, podczas gdy szara substancja zawiera mało włókien z osłonkami myelinowymi.

Wiadomo także, że takie karminowe barwienia ośrodków nerwowych udają się raz lepiej raz gorzej, a częstokroć wcale nie. To niepowodzenie przypisywano rozmaitym kaprysom karminu, obwiniano o nie niestały skład kupnego karminu, rozkładanie się rozczyńców karminowych i t. p.; ztąd wielka liczba przetworów karminowych zalecanych do użytku i ogromna liczba sposobów barwienia karminem stosowanych w technice histologicznej. Inni histolodzy przywiązują większą wagę do poprzedniego przygotowania preparatów przed barwieniem, podają ściśle przepisy, w jakich płynach (zawierających kwas chromowy lub chromany) i jak długo preparaty trzymać należy, zalecają trzymanie ich w cieple (w termostacie) lub w ciemności, dokładne i długie płukanie wodą i t. p. Mimo to żadna metoda nie jest tak doskonała, iżby na pewne prowadziła do celu pożądanego.

Te powszechnie znane fakta prowadzą do wniosku, że na barwienie się rozmaitych składników tkanin ustalanych lub przechowywanych w płynach zawierających kwas chromowy lub chromany mają wpływ nie tyle może same barwiki używane do barwienia, ile tkwiące w tkaninach związki chromu, czyli, że związki chromu na tkaniny działają jako zaprawy (bejce), które mają wpływ na barwienie.

Pragnąc rzecz tę zbadać, a mianowicie stwierdzić o ile działanie kwasu chromowego jako zaprawy zależy od koncentracji rozczyńcy i od czasu jak długo taki rozczyń działa, postanowiłem do barwienia używać przetworu karminowego, którego skład byłby ile możności stały i niezmienny. Takim przetworem jest niezawodnie »karminian sodowy« dostarczany przez aptekarza Blocha w Wrocławiu, zalecany przez Gierckiego¹⁾ w r. 1883, a cieszący się

¹⁾ Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, Tom I. (1883), str. 543.

powszechnem uznaniem wszystkich, którzy go używali. Zachęciły mnie do tego także wspaniałe preparaty otrzymane przez użycie karminianu sodowego, jakie posiada we Lwowie kol. Prof. Dr. Szymonowicz.

Początkowo używałem do barwienia roztworu karminianu sodowego sporządzonego ściśle wedle przepisu podanego w I. tomie podręcznika histologii wydanego przez Schiefferdeckera, Behrensa i Cossel'a w r. 1889 na str. 193 a więc 1‰ roztworu karminianu sodowego z dodatkiem 2 do 4 kropli nasyconego roztworu dwuwęglanu amonowego na 20CC tego barwika.

Jeżeli skrawki rdzenia pacierzowego lub mózgu otrzymane z kawałków ustalonych w aldehydzie mrówkowym włożyć wprost do tego barwika, otrzymuje się zwykłe zabarwienie jądrowe, tak samo jak używając innego barwika karminowego n. p. karminu boraksowego, karminu lithionowego i t. p.

Inaczej ma się rzecz, jeżeli preparaty leżały dłuższy lub krótszy czas w słabszym lub silniejszym roztworze kwasu chromowego. Wtedy oprócz jąder komórkowych barwią się także ciała komórek, barwi się neuroglia, barwią się niteczki osiowe, jednym słowem prawie wszystkie części składowe ośrodków nerwowych, a to jedne silniej inne słabiej. Wogóle jednak takie preparaty barwią się nie zawsze jednakowo a czasami źle.

Mimo licznych prób wykonywanych w ten sposób, że skrawki rdzenia ustalonego w aldehydzie mrówkowym wkładałem do roztworów kwasu chromowego rozmaitego zęszczenia (od 1‰ do 1‰) na krótszy lub dłuższy czas (od kilku minut aż do kilku i kilkudziesięciu godzin) nie mogłem stwierdzić stałej zależności wyników barwienia od długości czasu przez jaki działał roztwór kwasu chromowego, ani od zęszczenia jego roztworów.

Przy tem, jak powszechnie wiadomo skrawki bardzo sztywniały, a po dłuższym czasie stawały się ćme i kruche. Okazało się także, że roztwór kwasu chromowego, w którym skrawki leżały dłuższy czas zmieniał się, a mianowicie blednął lub całkiem się odbarwiał, że więc z roztworu ubywało kwasu chromowego, czy to przez to, że tkanina go pochłaniała, czy też dla tego, że pod wpływem preparatów ulegał rozkładowi. Sama już taka zmiana w roztworze używanym do doświadczeń, ściśłość takich doświadczeń czyni złudną, gdyż preparaty po jakimś czasie nie leżą już w takim roztworze, do jakiegośmy je włożyli.

Jak wiadomo, chromany działają na tkaniny podobnie jak kwas chromowy, lecz powolniej i »łagodniej«. Próby wszakże z roztworami chromanów a mianowicie dwuchromanu potasowego nie doprowadziły mnie do wyjaśnienia sprawy.

Przedewszystkiem przekonałem się, że działanie roztworów chromanu potasowego na skrawki środków nerwowych ustalonych w aldehydzie mrówkowym w ciągu kilku godzin a nawet w ciągu kilku dni, nie daje prawie żadnego wyniku. Skrawki takie względem karminianu sodowego zachowują

się tak, jakby wcale nie były zaprawiane. Wiadomo powszechnie, że nawet tkaniny świeże a zwłaszcza ośrodki nerwowe w chromanie potasowym, w chromanie amonowym, w płynie Müllera, w płynie Erlickiego i t. p. twar-
dnieją dopiero po tygodniach i miesiącach, a barwią się w sposób pożą-
dany dopiero wtedy, gdy były płukane we wodzie a następnie jeszcze ztwardnianie
ich ukończone w wyskoku; wiadomo też, że przy takim postępowaniu nie
zawsze preparaty się udają, tudzież, że czasami się otrzymuje lepsze a cza-
sami mniej zadowalniające zabarwienia. Aby zapewnić powodzenie temu
długotrwałemu postępowaniu, rozmaici histologowie zalecają przestrzeganie
rozmaitych osobliwych warunków, jak n. p. wkładanie małych kawałków do
wielkich ilości płynu, zawieszanie kawałków tak, aby nie leżały na dnie
naczynia, częste zmienianie płynu, trzymanie w termostacie, trzymanie w cie-
mności i t. p. — a do samego barwienia każdy zaleca przetwór karminowy
taki, przy którego użyciu powiodło mu się właśnie (może przypadkowo)
otrzymać preparaty jak najbardziej zadowalniające. Słowem stosowanie chro-
manów wydaje mi się rzeczą długotrwałą, kłopotliwą, kapryśną a ostatecznie
zawsze jeszcze niepewną.

Jakie sprawy chemiczne odbywają się w tkaninach podczas gdy preparat
w roztworze chromanowym leży miesiącami, o tem nie mamy prawie wyo-
brażenia, a trudnoby tę sprawę należycie zbadać. Domyślać się można tylko
tyle, że w tych warunkach odbywa się częściowe odtlenianie chromanów,
a tworzą się związki chromowe (w których chrom ma znaczenie zasadowe);
za tem przemawia ta okoliczność, że żółta barwa preparatów zamienia się
w zielonawą lub sinawą, a sam roztwór chromanowy blednie (dla tego wła-
śnie poleca się go odnawiać). W takich roztworach chromanowych częstokroć
rozwijają się pleśnie i bakterye, a to preparatom nie tylko nic nie szkodzi
lecz owszem może właśnie preparaty z takich roztworów lepiej się barwią.
Dłuższe (kilkudniowe) płukanie takich preparatów w płynącej wodzie może
właśnie także dla tego jest przydatne i zalecane, że przy tem następuje od-
tlenienie chromanów i przemiana ich w związki chromowe. Że wyskok (alkohol
etylowy), działa odtleniająco, rzecz jasna; wszakże preparaty chromowe wło-
żone do spirytusu przybierają barwę zielonawą lub całkiem niebieską —
a właśnie takie preparaty barwią się najlepiej.

Z tych faktów należy wyprowadzić przedewszystkiem wniosek, że w pre-
paratach ustalanych, jak to jest w powszechnym użyciu, w płynach zawiera-
jących kwas chromowy lub chromany, przy barwieniu tkanin jako zaprawa
w tkaninach działa nie tylko kwas chromowy a może nawet nie tyle kwas
chromowy, ile związki chromowe w nich zawarte, które powstały z odtlenie-
nia kwasu chromowego lub chromanów. Najrozmaitsze kombinacye kwasu
chromowego (lub chromanów) i związków chromowych (z chromem zasado-
wym), jakie w takich preparatach w ciągu długiego czasu, zwłaszcza pod

zmiennym wpływem powietrza, ciepła, bakteryj, pleśni, wody wodociągowej (przy opłukiwaniu) tudzież wysokoku, mogą się wytworzyć, tłumacząc dostatecznie niestałe wyniki takiego postępowania, formalne kaprysy, jakie okazują takie preparaty przy barwieniu.

Doszedłem do przekonania, że działania kwasu chromowego i chromanów na preparaty nie można prawie opanować, a w każdym razie że nie można dociec praw wedle których przeobrażenia związków chromu w takich preparatach się odbywają, aby następnie na podstawie tych praw sprowadzać rozmaite modyfikacje działania przetworów chromu, a mianowicie takie, któreby się okazały pożądanymi dla uzyskania pewnych zabarwień.

Z tych powodów postanowiłem przynajmniej na razie zaniechać dalszych prób z kwasem chromowym i chromanami.

Drugi wniosek, do którego doszedłem na podstawie powyższego rozumowania jest, że nie tyle od własności samego barwika (n. p. karminu) zależy działanie jego na tkaniny i składniki tkanin, ile od poprzedniego przygotowania tkanin a mianowicie od zawartości w nich chromu a w szczególności chromu zasadowego, który powstaje przez odtlenianie się chromanów lub kwasu chromowego. Będąc przekonany, że ten chrom zasadowy zawarty w tkaninach, działa jako zaprawa (bejca) mogłem przypuszczać, że w podobny sposób będą działały związki a mianowicie sole innych metalów. Ten wniosek był punktem wyjścia do dalszych moich badań.

Postanowiłem przed barwieniem skrawki ośrodków nerwowych ustalonych w aldehydzie mrówkowym napajać rozmaitemi solami metali ciężkich. Aby ich działanie na tkaninę stwierdzić z wykluczeniem wszelkich innych czynników, trzeba było do tych doświadczeń używać skrawków otrzymanych z rdzenia lub mózgu ustalonego w aldehydzie mrówkowym wprost, z ominięciem działania wysokoku, eteru, chloroformu, benzyny i t. p. płynów, które jak wiadomo rozpuszczają i wyciągają pewne składniki z tych tkanin. Nie można więc było w celu otrzymania skrawków zatapiać kawałków rdzenia lub mózgu w celloidynie lub w parafinie. Używałem przeto skrawków sporządzonych nożem, wolną ręką lub mikrotomem przy pomocy przyrządu do zamrażania¹⁾.

¹⁾ Z ośrodków nerwowych ustalonych w aldehydzie mrówkowym a następnie dłuższy czas płukanych i przechowywanych we wodzie przekrojonej można mikrotomem przy pomocy zamrożenia otrzymać bardzo piękne i cienkie (aż do 14 μ) skrawki, jeżeli krajany kawałek ma ciepłotę -0.5 do -1.0°C . Znaczniejsze oziębienie (poniżej -1.0°C .) sprawia, że preparat jest za twardy, tak, że nóż (oczywiście poprzecznie ustawiony) przy prędkim ruchu przeskakuje powierzchnię preparatu, przy powolnym zaś ruchu drga, wskutek czego powierzchnie skrawków nie są gładkie lecz prążkowane. W ciepłocie poniżej 0.5°C skrawki się zwijają w trąbkę, co ułatwia ich zdejmowanie z noża; w płynie (n. p. w wodzie) skrawki same się rozprostowują. Jeżeli ciepłota krajanego kawałka zbliża się do 0°C , wtedy skrawki

Z soli metalowych uważałem za najprzydatniejsze do pierwszych doświadczeń takie, które mając własną barwę, nadają ją tkaninom w miarę jak w nie wnikają. Można bowiem bez szczególnych badań bardzo łatwo z barwy tkaniny oceniać, czy i o ile ona jest napojona taką barwną solą i czy to napojenie jest trwałe, albo czy przez płukanie wodą i t. p. daje się usunąć. Z tego powodu najpierw zająłem się próbami z siarkanem miedziowym.

Jeżeli skrawek rdzenia pacierzowego lub mózgu ustalonego w aldehydzie mrówkowym, leżał jakiś czas (n. p. kilka godzin lub kilka dni) w roztworze zawierającym na 100 części wody 1 do 5 części siarkanu miedziowego, wtedy biała substancja przybiera barwę pięknie błękitną, podczas gdy szara substancja wydaje się w obec niej żółtawą. Już samo stwierdzenie tego faktu przemawia za tem, że jest jakaś różnica w działaniu siarkanu miedziowego na substancję białą i na substancję szarą, i budzi nadzieję, że w zaprawionych solą miedziową preparatach ośrodków nerwowych, po zabarwieniu n. p. karminem uwidoczni się jeszcze lepiej różnica między substancją szarą a substancją białą.

Włożywszy skrawek wyjęty z roztworu siarkanu miedziowego, albo wprost albo po krótkiem opłukaniu w wodzie, do roztworu karminianu sodowego, przekonałem się wszakże, że o barwieniu się takiego skrawka nie może być mowy, gdyż barwik się mąci, a karmin na powierzchni skrawka osadza się, tworząc ciemno-czerwone plamiste warstwy na obu jego powierzchniach.

Nie zrażając się tym faktem, próbowałem takie skrawki przed włożeniem do barwika w odpowiedni sposób płukać. Na ten cel woda przekroplona nie wydawała mi się odpowiednią, gdyż krótkie płukanie nie wystarcza, a po dłuższym czasie skrawki w niej tracą barwę błękitną, co jest dowodem, że woda z nich wyciąga przynajmniej przeważną ilość siarkanu miedziowego; nadto we wodzie takie skrawki znacznie pęcznieją, wichrują się i garbią. Próbo-

się nie zwijają; gdy wszakże temperatura dojdzie do 0°C, to oczywiście już nie można krajać. Pracując w zwykłej temperaturze pokojowej trudno jest utrzymać krajany kawałek w odpowiedniej temperaturze. Najkorzystniej jest krajać w lokalu, w którym panuje ciepłota między -1°C i 0°C. co w porze zimowej można mieć bardzo łatwo.

Inaczej ma się rzecz jeżeli krajemy zamrożone kawałki rdzenia lub mózgu przesiąknięte nie wodą czystą, lecz roztworami soli (n. p. chlorku sodowego, dwuwęglanu sodowego i t. p.). Wtedy temperatura, w której takie kawałki dobrze się krają jest znacznie niższa, a granice dla »optimum« tej ciepłoty są rozleglejsze i wynoszą kilka stopni. Tak n. p. dla kawałków przesiąkniętych płynem zawierającym na 100 cz. wody 5 cz. aldehydu mrówkowego i 2 cz. dwuwęglanu potasowego, najkorzystniejszą do krajania jest ciepłota między -10°C. a -15°C. W podobnych też granicach ciepłoty krają się dobrze kawałki przesiąknięte płynem zawierającym na 100 cz. wody 5 cz. aldehydu mrówkowego i 1 cz. kwasu octowego. Ciepłota przy krajaniu kontroluje się ciepłomierzem, którego gałkę włożono przez otwór do puszki, w której się eter rozpyla.

wałem więc przedewszystkiem, skrawki rdzenia napojone siarkanem miedziowym płukać w roztworze dwuwęglanu amonowego w przekonaniu, że włożwszy je potem do czystego roztworu karminianu sodowego spowoduje podobne działanie tego barwika jak Schiefferdecker (l. c.) z tą tylko różnicą, że tu barwik będzie działał na tkaniny zaprawione solą miedziową. Taki sposób barwienia wydawał mi się obiecującym tem bardziej, że w dwuwęglanie amonowym $\text{CO} < \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{O}-\text{NH}_4 \end{smallmatrix}$ skrawki przybierały barwę żywobłękitną, przyczem różnica między istotą białą (silnie błękitną) a istotą szarą jeszcze wybitniej występowała niż zaraz po wyjęciu z siarkanu miedziowego. Siarkan miedziowy pod wpływem soli amonowej tu właśnie tworzył znany siarkan miedziowo-amonowy odznaczający się nasyconą barwą błękitną.

Dwuwęglan amonowy wszakże zamieniając siarkan miedziowy w ten rozpuszczalny związek amonowy, wnet wyciąga sól miedziową zawartą w tkaninie rdzenia pacierzowego. Dlatego więc skrawków napojonych siarkanem miedziowym nie można długo płukać w dwuwęglanie amonowym, który z nich sól miedziową zupełnie wyciąga. Jeżeli zaś takie skrawki były w dwuwęglanie amonowym płukane tylko przez kilkadziesiąt sekund lub najwyżej kilka minut, i włożone do roztworu karminianu sodowego, to wtedy otrzymujemy zabarwienie karminowe w szarej substancji o wiele silniejsze niż w substancji białej; różnica tych dwóch substancji na takich preparatach uwydatnia się nierównie wybitniej niż przez zwykłe zabarwienia jądrowe. Sposobu tego wszakże zaniechałem wnet z powodu, że dawał wyniki niejednakowe a to zależnie od tego czy skrawki dłużej lub krócej były płukane w węglanie amonowym; bardzo zaś trudno byłoby oznaczyć i odmierzyć ściślejsz czas, przez który należałoby skrawki w dwuwęglanie amonowym płukać, aby uzyskać zabarwienie ile możności jak najkorzystniejsze, skoro ten czas nie może wynosić więcej, niż kilkadziesiąt sekund. Zresztą inne próby dawały wyniki o wiele lepsze i pewniejsze.

Próbując bowiem skrawki rdzenia napojone siarkanem miedziowym przed włożeniem do barwika płukać w innych, stosownych roztworach i używszy w tym celu między innemi octanu potasowego, przekonałem się, że zwłaszcza w rozcieńczonym tym płynie (1 cz. liquoris kalii acetici na 10 cz. wody) skrawki nawet po bardzo długim czasie nie tracą barwy niebieskiej, która jest oznaką, że w tkaninie tkwi połączenie miedziowe. Skrawki przyrządzone w ten sposób w 1% roztworze karminianu sodowego już w ciągu kilku lub kilkunastu sekund barwiły się tak, że różnica między istotą szarą (barwiącą się silnie) a istotą białą (barwiącą się tylko mniej lub więcej blado-różowo) występowała bardzo wybitnie. Rozmaitem nasyceniem zabarwienia uwydatniały się nawet różnice między rozmaitemi częściami szarej substancji: tak n. p.

bardzo intensywnie barwiły się substancje kleiste, środkowa i Rolandowa, a jeszcze wybitniej występowało jądro zębate oliwy.

Badając takie skrawki pod mikroskopem, przekonałem się, że w szarej istocie można rozróżnić komórki zwojowe silnie zabarwione, zresztą jednak ta substancja jest zabarwiona prawie jednostajnie i trudno w niej dopatrzeć szczegółów budowy; w białej substancji jest zabarwiona neuroglia, można rozróżniać dosyć dobrze komórki pajęczynowate, a tu i ówdzie napotyka się także zabarwione niteczki osiowe włókien nerwowych. Co wszakże szczególnie wydaje mi się uwagi godnem, przekonałem się na używanych do tych prób skrawkach dosyć grubych (150μ do 200μ), że preparat nie zabarwia się na wskrós, lecz że tylko około 20μ do 30μ grube warstwy na obu jego powierzchniach są zabarwione (co można stwierdzić przy pomocy śrubki mikrometrycznej z podziałką).

Zachęcony tymi wynikami, postanowiłem do dalszych prób zamiast siarkanu miedziowego, który przez następne stosowanie octanu potasowego już w samych skrawkach przemieniałem w octan miedziowy, używać do napajania skrawków wprost octanu miedziowego.

Przekonałem się przedewszystkiem, że skrawki rdzenia włożone do roztworu octanu miedziowego (0.5% do 5.0%) już w krótkim czasie przybierają barwę niebieską, w istocie białej zwłaszcza się uwydatniającą, i że tego zabarwienia nie tracą nawet po kilkudniowym płukaniu we wodzie. Zmieniwszy kilkakrotnie wodę, użytą do płukania takich skrawków stwierdziłem, że woda z nich już nie wyciąga związków miedziowych; przynajmniej za pomocą żelazunku potasowego w tej wodzie już nie można było wykazać obecności miedzi. Z tąd wyprowadziłem wniosek, że zaprawa tkaniny octanem miedziowym jest trwałą, podczas gdy ze skrawków napojonych siarkanem miedziowym woda po jakimś czasie prawie zupełnie wyciąga sól miedziową. Fakta te mojem zdaniem przemawiają za przypuszczeniem, że zaprawianie (impregnacja) tkanin solami metalowemi nie polega jedynie na tem, że tkaniny są napojone mechanicznie użytym do zaprawy roztworem, lecz że odnośna sól metalowa oddziałuje chemicznie na pewne składniki tkaniny a mianowicie na związki organiczne wchodzące w skład tkaniny, a to w ten sposób, że metal (n. p. miedź) wstępuje w te związki organiczne w miejsce jednego lub kilku atomów wodoru (zasadowych) a w roztworze powstaje bądź to wolny kwas, bądź to kwaśna sól metalowa. Czy i o ile takie oddziaływanie między solą metalową i danymi związkami organicznymi wchodzącymi w skład tkanin nastąpi, zależy musi od tego, czy sól metalowa sama jest związkiem silniejszym lub łatwiej się rozkładającym; wydaje się więc rzeczą z góry prawdopodobną, że z pomiędzy rozmaitych soli tego samego metalu na związki organiczne łatwiej i wydatniej będą oddziaływały te, których rodnik kwasowy jest słabszy. Wychodząc z tego założenia łatwo można sobie

objaśnić, jakim sposobem octan miedziowy jest do zaprawy tkaniny przydatniejszy aniżeli siarkan miedziowy.

Na podstawie powyższego rozumowania postanowiłem zająć się badaniem nad barwieniem tkanin, a przede wszystkim ośrodków nerwowych zaprawianych rozmaitemi solami metali ciężkich, a do zaprawy używać soli metalowych ze słabymi rodnikami kwasowymi a mianowicie przede wszystkim octanów.

Dotychczas badałem w tym względzie działanie octanu miedziowego, octanu uranowego i octanu ołowiowego. Setki prób, jakie z tymi odczynnikami wykonałem, dozwoliły mi wysledzić przede wszystkim pewne ogólne prawa, wedle których odbywa się zabarwienie w skrawkach rdzenia i mózgu zaprawionych tymi octanami.

Jeżeli skrawek zaprawiony octanem miedziowym lub octanem uranowym lub octanem ołowiowym włożymy do roztworu karminianu sodowego, wtedy prawie natychmiast zaczyna się on barwić. W pierwszych chwilach przyjmuje karminowe zabarwienie istota szara, a podczas gdy ona coraz silniej się barwi, prędzej lub później zaczyna się barwić także istota biała; albo też obie istoty zaczynają się barwić równocześnie, lecz szara istota silniej niż biała. Gdy więc istota szara przybrała już możebnie najsilniejsze zabarwienie czerwone (takie jakie ma zgęszczony roztwór karminu), to biała substancja jest dopiero mniej lub więcej różowa, lecz ciemniejsza coraz bardziej, jeżeli preparat ciągle pozostaje w roztworze karminu. Nareszcie następuje chwila, w której zabarwienie istoty białej dorównywa intensywnością zabarwieniu istoty szarej, tak, że preparat cały jest jednostajnie zabarwiony. Na tem wszakże nie kończy się działanie barwika, lecz odbywa się zjawisko niespodziewane, które w pierwszej chwili wydaje się paradoksalnem: szara istota zaczyna blednąć i odbarwia się nareszcie mniej lub więcej zupełnie, a także, albo już podczas tego, albo później, odbarwia się biała istota. Następuje potem okres, w którym cały preparat jest znowu zupełnie bezbarwny, albo prawie bezbarwny. Jeżeli taki preparat, który po zaprawieniu octanem miedziowym lub octanem uranowym w roztworze karminianu sodowego się zabarwił a następnie już znowu odbarwił, pozostawimy ciągle jeszcze w tym barwiku, to on znowu się barwi, tak, że po kilku albo kilkudziesięciu godzinach znajdziemy w nim zwykłe zabarwienie jądrowe; preparaty zaprawione octanem miedziowym lub octanem uranowym, po dłuższem działaniu karminianu sodowego, który je najpierw zabarwił a potem odbarwił, zachowują się tak, jak gdyby wcale nie były zaprawiane temi solami metalowemi.

Przebieg tej reakcyi można najlepiej śledzić, jeżeli do tego celu używamy miseczki porcelanowej (n. p. parowniczkę) a igiełką lub cienko wyciągniętym a na końcu zatopionym pręcikiem szklannym, przytrzymując skrawek tak, aby przylgnał do dna, przechylamy miseczkę w tę i w ową stronę, aby roztwór

barwika na przemian to ze skrawka odpływał to go znowu oblewał — podobnie, jak się to czyni przy wywoływaniu obrazów na płytach fotograficznych. Działanie barwika można oczywiście w każdej chwili przerwać przenosząc skrawek do wody lub innego płynu, w którym się go opłukuje lub odławszy roztwór barwikowy tak, aby skrawek pozostał przyklepiony, do dna miseczki i nalewając nań płynu służącego do płukania.

Prędkość przebiegu i szczegółowy przebieg, tudzież wynik reakcji karminianu sodowego na skrawki ośrodków nerwowych zaprawionych octanem miedziowym lub octanem uranowym lub octanem ołowiowym zależy od rozmaitych okoliczności a mianowicie przede wszystkim od zgęszczenia roztworu karminianu sodowego i od grubości skrawków. Im bardziej rozcieńczamy roztwór karminianu sodowego, tem powolniej skrawki się barwią i tem powolniej następnie odbarwiają; im grubsze mamy skrawki, tem więcej czasu trzeba, aby zabarwienie, zwłaszcza w istocie białej, doszło do największego nasilenia; czas zaś potrzebny do odbarwienia się grubych skrawków może być bardzo długi, a jeżeli preparat jest zanadto gruby, wtedy nawet nie udaje się jego zupełne odbarwienie.

Także poprzednie traktowanie preparatów i skrawków ma wpływ na przebieg i ostateczny wynik tej reakcji, równie jak rozmaite odczynniki, które możemy w ciągu całego postępowania zastosować, albo dodając je już do roztworu aldehydu mrówkowego, w którym ustalamy ośrodki nerwowe, albo traktując niemi ustalone już kawałki mózgu lub rdzenia lub skrawki tychże, albo dodając ich do roztworu barwika, lub używając rozmaitych roztworów do płukania już zabarwionych skrawków.

Mamy więc możność przez rozliczne kombinacje tych czynników i odczynników sprowadzać najrozmaitsze odmiany w zabarwieniu preparatów.

Zaznaczyć należy, że to co dostrzegamy podczas działania barwika na zaprawione skrawki, i na zabarwionych skrawkach, gołym okiem, jest tylko ogólnym, poniekąd sumarycznym wyrazem sprawy barwienia a względnie następowego odbarwiania się najróżniejszych histologicznych składników ośrodków nerwowych. Tak bowiem w istocie szarej jak też w istocie białej nie wszystkie morfotyczne pierwociny barwią się równocześnie i nie wszystkie w tym samym czasie się odbarwiają, a właśnie czynniki, których działanie podczas tej reakcji możemy wprowadzić, ułatwiają lub przyspieszają nie tylko całą sprawę wogóle, lecz ułatwiają, przyspieszają, lub utrudniają i opóźniają barwienie się lub odbarwianie się jednych lub innych składników tak szarej jako też białej istoty.

Nie ulega więc wątpliwości, że w działaniu karminianu sodowego (i innych barwików) na preparaty tkanin a mianowicie ośrodków nerwowych zaprawione octanem miedziowym, octanem uranowym i t. p. mamy swoisty odczynnik na rozmaite morfotyczne składniki tych narządów

a mianowicie nie tylko na istotę białą i istotę szarą wogóle, lecz także na rozmaite rodzaje istoty szarej (i białej), tudzież na rozmaite histologiczne pierwociny, które wchodzą w skład jednej i drugiej istoty.

Już pierwsze moje w tym względzie na wiosnę 1898 poczynione spostrzeżenia naprowadziły mnie na myśl, że przez odpowiednie modyfikacje reakcyi barwików na preparaty ośrodków nerwowych, zaprawionych solami (octanami) metalów ciężkich można będzie znaleźć rozmaite sposoby barwienia, które dozwolą uwidocznąć rozmaite składniki ośrodków nerwowych, każdy z osobna, które znajdą szerokie zastosowanie w technice anatomicznej i histologicznej, a może i takie, które dozwolą wykryć nowe szczegóły w budowie tych narządów, dotychczas dla nas ukryte.

Nim wszakże przystąpiłem do szczegółowego wypróbowania rozmaitych możebnych i nasuwających się modyfikacyj tego sposobu barwienia, starałem się ile możliwości dojsć do jakiejś teoryi tej reakcyi, któraby objaśniała działanie karminianu sodowego na preparaty ośrodków nerwowych zaprawione solami (octanami) metalowemi.

W tym celu starałem się przedewszystkiem poznać działanie karminianu sodowego na octan miedziowy i na octan uranowy. Dodawałem więc kroplami bardzo rozcieńczonego (1‰ i mniej) octanu miedziowego do roztworu karminianu sodowego. Przekonałem się, że kropla octanu miedziowego w roztworze karminianu sodowego w pierwszej chwili sprawia ciemne zmętnienie (osad), który po zamieszaniu płynu znika (rozpuszcza się w nadmiarze karminianu sodowego). Przy tem roztwór karminowy po dodaniu pierwszych kropeł roztworu octanu miedziowego przybiera zabarwienie żywsze (podobne do safraniny). Jeżeli zaś dodajemy zwolna większe ilości octanu miedziowego, wtedy roztwór, o ile osad się jeszcze rozpuszcza, przybiera zabarwienie ciemniejsze, wiśniowe, wpadające we fiołkowe; w końcu za wielką ilością dodanego roztworu octanu miedziowego sprawia trwałe osad ciemno-czerwony, czarniawy; aż ostatecznie można w ten sposób całą ilość karminu wydzielić z roztworu. Octan miedziowy sprawia więc w roztworze karminianu sodowego osad (niezawodnie karminianu miedziowego), który w nadmiarze karminianu sodowego jest rozpuszczalny.

Podobną reakcją z octanem miedziowym, jak wiadomo, daje żelazinek potasowy: powstaje brunatny osad, który w nadmiarze żelazinku potasowego rozpuszczając się sprawia brunatne zabarwienie pierwotnie blado-żółtego roztworu; jeżeli zaś do żelazinku potasowego dodamy większych ilości soli miedziowej, natenczas powstający osad brunatny już się nie rozpuszcza.

Przypuszczam więc, że w rdzeniu lub w mózgu zaprawionym octanem miedziowym a włożonym do roztworu karminianu sodowego odbywa się sprawa podobna, jak przy zmieszaniu roztworów tych dwóch ciał a mianowicie przy dodaniu octanu miedziowego do karminianu sodowego.

Z powodów wszakże już wyżej przytoczonych muszę przypuszczać, że w preparacie zaprawionym w octanie miedziowym, a dostatecznie spłukanym we wodzie lub jakim płynie wodnistym, octan miedziowy nie jest już zawarty jako taki, lecz że miedź, z octanu miedziowego weszła w związki chemiczne z rozmaitemi ciałami organicznymi wchodzącymi w skład rozmaitych histologicznych pierwocin ośrodków nerwowych, zastąpiwszy w nich prawdopodobnie pewne zasadowe atomy wodoru lub może sodu albo potasu. Organiczne związki miedzi powstałe przez zabarwienie tkaniny, działają na karminian sodowy niezawodnie w ten sam sposób, jak octan miedziowy: w pierwszej chwili tworzy się nierozpuszczony karminian miedziowy, który będąc zawarty w samych pierwocinach histologicznych tkaniny nadaje im barwę karminową, która pozostaje i jest trwałą, jeżeli w stosownej chwili preparat wyjmujemy z roztworu karminianu sodowego. Jeżeli wszakże preparat pozostanie dłużej w karminianie sodowym, wtedy, zawarty w pierwocinach tkaniny karminian miedziowy zamienia się w stan (albo raczej w związek) rozpuszczalny i następuje odbarwienie.

Przypuszczenie że przy tej reakcji oddziałują na karminian sodowy nie octan miedziowy jako taki, lecz rozmaite związki organiczne miedzi, które powstały w tkaninie, oparte jest właśnie na fakcie, że reakcja ta t. j. barwienie i odbarwienie nie we wszystkich pierwocinach histologicznych tkaniny odbywa się jednocześnie i jednakowo, co by musiało dziać się, gdyby tu działał sam tylko octan miedziowy, którym tkanina byłaby tylko napojona. Że tkanina preparatów zaprawionych octanem miedziowym, zawiera miedź chemicznie z nią związaną, dowodzi zresztą i ta okoliczność, że zawartości miedzi z takich preparatów nie można wyciągnąć przez proste, choćby najdłuższe, płukanie wodą, podczas gdy skrawki zaprawione octanem miedziowym, które karminem były traktowane aż do zupełnego odbarwienia się, zachowują się tak, jak skrawki niezaprawione a pozostając dłużej w karminianie sodowym dają zwykłe zabarwienie jądrowe.

Mamy więc prawo przypuszczać, że pod wpływem octanu miedziowego w rozmaitych histologicznych częściach składowych, zależnie od ich rozmaitego składu chemicznego, tworzą się rozmaite organiczne związki miedziowe, z których jedne łatwiej i prędzej się rozkładają a zatem także łatwiej i prędzej z działającym na nie karminianem sodowym tworzą karminian miedziowy, a inne trudniej i dopiero po dłuższym czasie. Jasną zaś jest rzeczą, że te pierwociny histologiczne, w których wcześniej tworzy się karminian miedziowy i które wcześniej się zabarwiły, także wcześniej się odbarwiają. Można też łatwo pojąć, że rozmaite inne ciała, które przy tej reakcji mogą być wprowadzane do tkaniny lub do roztworu karminianu sodowego, mogą ułatwiać lub utrudniać, przyspieszać lub opóźniać, albo nawet uniemożliwiać

tę sprawę chemiczną, której wynikiem jest karminian miedziowy tworzący się w samychże pierwocinach tkaniny i nadający im barwę karminową. Tak samo wydaje mi się rzeczą jasną, że pewne odczynniki, które podczas tej reakcyi możemy wprowadzić w grę, mogą ułatwiać lub utrudniać, przyspieszać lub opóźniać rozpuszczanie się karminianu miedziowego, tkwiącego w rozmaitych składnikach histologicznych ośrodków nerwowych w nadmiarze karminianu sodowego, a więc ułatwiać lub utrudniać, przyspieszać lub opóźniać odbarwienie się tych lub owych składników tkaniny.

Pragnąc tę teorię sprawdzić ilemożności wprost, wkładałem skrawki rdzenia zaprawionego octanem miedziowym do roztworu rozcieńczonego żelazinku potasowego. Tym sposobem przekonałem się, że żelazinek potasowy, który ze solami miedziowymi a mianowicie z octanem miedziowym daje taką samą reakcyę (pominąwszy różnicę barwy), jak karminian sodowy, na zaprawione octanem miedziowym preparaty działa również tak samo, jak karminian sodowy. Na preparatach ośrodków nerwowych, zaprawionych octanem miedziowym w roztworze żelazinku potasowego najpierw istota szara przybiera zabarwienie brunatne, następnie takie same zabarwienie przybiera substancja szara a w końcu także substancja biała. Zabarwienie to w preparatach jest trwałe (można je tak samo jak karminowe opłukać, przenieść do wysoku, chloroformu i przechować w balsamie) a oczywiście takie same jak osad w roztworze octanu miedziowego sprawiony żelazinkiem potasowym a więc blado-orzechowo-brunatne.

Przekonałem się także, że preparaty ośrodków nerwowych, zaprawione w octanie miedziowym, barwią się także w roztworze (1‰) hematoksyliny podobnie jak w karminie: najpierw barwi się fiołkowo szara substancja a dopiero później substancja biała. Odbarwienie wszakże nie odbywa się, lecz preparaty tem silniej się barwią, im dłużej pozostają w hematoksylinie; bo też nadmiar roztworu hematoksyliny nie rozpuszcza osadu (ciemno-błękitnego), który w nim sprawił roztwór octanu miedziowego.

Także w roztworach barwików anilimowych (n. p. w błękiecie metylenowym) preparaty ośrodków nerwowych zaprawione miedzią, w octanie miedziowym barwią się wedle tych samych praw, jak w roztworze karminianu sodowego. Zabarwienie to wszakże nie jest trwałe: woda i wyskok wyciągają barwik.

Octan uranowy działa podobnie jak octan miedziowy lecz poniekąd silniej. Za to barwienie skrawków, zaprawionych w octanie uranowym, w roztworach karminianu sodowego odbywa się powolniej, a zwłaszcza odbarwianie się trwa dłużej, co dla pewnych celów praktycznych jest bardzo korzystne. Także z żelazinkiem potasowym preparaty zaprawione w octanie uranowym dają taką samą reakcyę, jak preparaty zaprawione w octanie miedziowym, a mianowicie zabarwiają się a następnie odbarwiają się. Barwa ich jest wszakże piękniejsza i bardziej nasycona, podobna do zabarwień vesuvinem.

Także za pomocą hematoksyliny można otrzymać piękne zabarwienie szarej substancji w skrawkach zaprawionych octanem uranowym.

Czyniłem także niektóre próby stosując jako zaprawę 1% roztwór octanu ołowiowego i przekonałem się, że i ta zaprawa działa w podobny sposób jak octan miedziowy i octan uranowy. Może być, że dalsze próby z octanem ołowiowym dadzą wyniki przydatne w technice barwienia.

Natomiast próby z octanem chromowym (po którym wiele się spodziewałem), z octanem niklowym, z octanem kobaltowym i z octanem manganowym nie dały wyników zachęcających do ich zastosowania.

Octanów innych metalów ciężkich dotychczas nie próbowałem używać jako zaprawy.

Na podstawie powyższych danych starałem się przy zastosowaniu zaprawy miedziowej i uranowej znaleźć sposoby barwienia ośrodków nerwowych ile możliwości proste, łatwe i pewne, któreby służyły do otrzymania preparatów przydatnych do demonstracji i do badań naukowych.

Jakkolwiek tej pracy nie uważam jeszcze za ukończoną, zwłaszcza, że mamy przed sobą nieprzebraną liczbę najrozmaitszych możebnych kombinacji i odmian, które dać może stosowanie powyższej zasady barwienia, jednakże w ciągu moich doświadczeń otrzymałem między innymi, niektóre tak uwagi godne wyraziste i świetne zabarwienia, że uważam za swój obowiązek, jak najspieszniej podać je do wiadomości interesowanych badaczy, w przekonaniu, że znajdą uznanie i zastosowanie.

Sposoby otrzymania takich, praktycznie przydatnych zabarwień zależą na odpowiednich modyfikacjach reakcji karminianu sodowego na preparaty zaprawione w octanie miedziowym lub octanie uranowym za pomocą pewnych odczynników stosowanych przy zaprawianiu i barwieniu.

Przy znalezieniu tych modyfikacji, jak to się często zdarza przy rozmaitych odkryciach, bywał mi pomocny szczęśliwy przypadek, który powiodło mi się należycie wyzyskać.

Już wspomiałem o tem, że skrawki zwłaszcza grubsze napojone siarkanem miedziowym, po wyjęciu z niego całkiem płaskie i równe, po włożeniu do wody przekroplonej lub wodnego roztworu karminianu sodowego pęczniały a przez to wichrowały się do tego stopnia, że nie przylegały do dna miseczki, a dopiero w wyskoku dawały się wyprostować t. j. zamienić napowrót w płaskie płatki, zwłaszcza gdy je palcem przyciskałem do dna. To samo działo się ze skrawkami zaprawionymi w octanie miedziowym.

Byłaby to niedogodność, którąby nareszcie można ścierpieć. Jednakże przyszło mi na myśl, że to pęcznienie może być powodem, że skrawki w roztworze karminowym nie barwią się na wskrós (zob. str. 11) lecz tylko na swoich powierzchniach. Zwiększające się obwodem przy pęcznieniu ciśnienie

wśród samej tkaniny preparatu mogłoby być samo przez się przeszkodą nie-
dozwalającą, aby barwnik wnikał do głębszych warstw preparatu.¹⁾

Aby zapobiedz temu pęcznieniu, które zresztą mogłoby także psuć struk-
turę histologiczną preparatów, próbowałem skrawki po rozczywie octanu mie-
dziowego płukać nie w czystej wodzie, lecz w rozczywie soli (chlorku sodo-
wego). Osiągnąłem wprawdzie skutek pożądaný t. j., że skrawki nie pęczniały,
jednakże okazało się, że nie można było barwić ich w karminianie sodowym.
Przekonałem się bowiem, że chlorek sodowy dodany do rozczywu karminianu
sodowego, wprawdzie nie osadza karminianu natychmiast, lecz że po jakimś
czasie powstaje papkowaty strą, który też osadza się na powierzchniach
skrawków napojonych słoną wodą.

Próbowałem więc w tym celu używać innych soli obojętnych n. p. bo-
raksu, tudzież cukru, jednakże i te okazały się nieprzydatnymi, z tego samego
powodu, co chlorek sodowy. Miałem pod ręką azotan potasowy — a z tym
próba powiodła się, ku memu zupełnemu zadowoleniu. Dodatek azotanu
potasowego choćby nawet kilkunastoprocentowy nie strąca z rozczywu karmi-
nianu sodowego.

Wykonałem więc szereg prób barwienia skrawków, zaprawionych octa-
nem miedziowym, które następnie płukałem w 2% rozczywie azotanu potaso-
wego i barwiłem w rozczynach 0.1% do 2.0% karminianu sodowego zawie-
rających nadto 2% azotanu potasowego. Właściwie dopiero teraz wykryłem
ogólne prawa, wedle których działa karminian sodowy (i inne ciała barwiące)
na skrawki ośrodków nerwowych zaprawione octanem miedziowym. Także do-
piero teraz powiodło mi się zabarwić na wskrós skrawki 60 μ do 100 μ grube.
Na takich preparatach dostrzegłem między innemi, że barwią się wybitnie
także niteczki osiowe.

Po licznych próbach, które zasadzały się na tem, że skrawki trzymałem
dłużej lub krócej w rozczynach barwiku słabszych lub bardziej nasyconych,
a skrawki opłukiwałem bądź to w 2% rozczywie azotanu potasowego, bądź
to przez chwilę we wodzie a następnie w słabym (30%) wysoku, i przeni-
siłem je stopniowo do coraz to silniejszego wysoku (aby zapobiedz kurcze-
niu się skrawków i naruszeniu ich struktury) w dniu 28. maja 1898 otrzy-
małem kilka preparatów z pierwszego szyjnego odcinka rdzenia pacierzowego,²⁾

¹⁾ Obecnie wiem stanowczo, że przeszkodą barwienia się głębszych części preparatu
jest ta okoliczność, że powierzchowne warstwy preparatu zabierają z rozczywu karminian
sodowy, z którego się tworzy nierozpuszczalny karminian miedziowy; dopiero gdy nad-
miar barwnika rozpuszcza to nowe połączenie, gdy więc powierzchowna warstwa się odbar-
wia, może karminian sodowy działać na głębsze warstwy.

²⁾ Pierwszym szyjnym odcinkiem (segmentem) rdzenia pacierzowego, jak wiadomo,
zowie się ta część rdzenia, z której wychodzą korzenie pierwszego nerwu szyjnego.

w których prawie wszystkie niteczki osiowe białej i szarej istoty mają zabarwienie tak nasycone i świetne, jak tylko można sobie wyobrazić i życzyć, podczas gdy wszystkie inne składniki tkaniny są prawie zupełnie bezbarwne, nawet jądra komórkowe ledwie dostrzegalne i tylko komórki zwojowe słabo różowe. Otrzymałem więc wyłączone, czyli wyborowe (*electiv*) zabarwienie karminem niteczek osiowych.

Na jednym z tych preparatów jest kartka z dokładnym opisem sposobu jego przyrządzenia, z której wynika, że preparat ten otrzymałem w sposób następujący: Skrawki rdzenia ustalonego w 10% roztworze aldehydu mrówkowego przez 10 dni i trzymanego następnie w czystej wodzie przekrojonej (prawdopodobnie kilka tygodni) otrzymane mikrotomem przez zamrożenie, były włożone do 2% roztworu saletry, następnie do 1% roztworu octanu miedziowego, w którym leżały przez kilka dni. Potem skrawki te były płukane w 2% roztworze saletry potasowej przez 24 godzin, barwione w płynie zawierającym 1% karminianu sodowego i 2% saletry przez kilkanaście minut a mianowicie tak długo, aż szara substancja do pewnego stopnia się odbarwiła, potem płukane w 2% roztworze tak długo, aż przestały oddawać barwik, a w końcu przeniesione wprost do absolutnego alkoholu, ztąd do chloroformu i zachowane w balsamie kanadyjskim.

Pragnąc wedle tej recepty sporządzić preparaty z rozmaitych innych kawałków rdzenia ustalonych w aldehydzie mrówkowym, napotkałem na nie spodziewane niepowodzenie, które zmusiło mnie bardzo wiele trudu i czasu poświęcić dokładniejszemu zbadaniu warunków, od których dopełnienia zależy otrzymanie wyłącznego i doskonałego zabarwienia niteczek osiowych w ośrodkach nerwowych. W pracy tej nastąpiła nadto pewna przerwa, prawie cały rok trwająca, z powodu, że w roku szkolnym 1898/9 przypadł mi z wyboru kolegów zaszczytny urząd rektora Uniwersytetu lwowskiego.

Nie będę oczywiście opisywać całej Odyssei, którą odbyłem idąc po nitce do kłębka. Nadmienię tylko, że główną przyczyną niepowodzenia było, że przyrządzając dla dalszych doświadczeń, jako zapasowy płyn zasadniczy, 100CC. roztworu 5% octanu miedziowego, który dla zaprawiania preparatów rozcieńczałem na roztwór 0.5% do 1.0%, dodałem był, nieprzeczuwając niczego złego, kilka kropli kwasu octowego, aby ułatwić zupełne rozpuszczenie się kryształów octanu miedziowego i mieć roztwór zawierający ściśle 5 grm. na 100CC. Roztwór ten wystarczył na długi czas do licznych prób, które nie dawały wyników pożądaných, — a dopiero gdy go zabrakło i sporządzałem nowy, przypomniałem sobie o dodawanym kwasie octowym i wpadło mi na myśl, że taki dodatek może być korzystnym albo też szkodliwym.

Ten błąd popełniony a srodze odpokutowany, naprowadził mnie wszakże na inne odkrycie. Przekonałem się wprawdzie, że dla należytego zabarwienia niteczek osiowych nieodzownym warunkiem jest, aby skrawki były zaprawio-

ne w roztworze octanu miedziowego, niezawierającym ani śladu wolnego kwasu octowego, natomiast wykryłem, że dla otrzymania wyłącznego zabarwienia istoty szarej tak, aby istota biała pozostała zupełnie bezbarwną, najkorzystniej jest zaprawiać preparaty w roztworze octanu uranowego, zakwaszonego kwasem octowym.

Nim przystąpię do szczegółowego opisu postępowania prowadzącego do tych praktycznie pożądaných zabarwień, wypada mi jeszcze streścić wyniki moich doświadczeń nad wpływem niektórych czynników i odczynników na wyniki działania karminianu sodowego na skrawki ośrodków nerwowych, zaprawionych octanem miedziowym i octanem uranowym.

Przedewszystkiem należy uwzględnić wpływ samego płynu ustalającego i w ogóle czynników działających na preparaty i skrawki rdzenia lub mózgu przed ich zaprawianiem.

Skrawki, w których w dniu 28. maja 1898 otrzymałem wyłączne zabarwienie niteczek osiowych, o ile sobie przypominam pochodziły z rdzenia ustalonego w roztworze zawierającym na 100 cz. wody przekroplonej 5 cz. aldehydu mrówkowego i 10 cz. chlorku sodowego. Pragnąc bowiem, aby mózgi przy ustalaniu w aldehydzie mrówkowym zatrzymywały kształty naturalne i nie spłaszczały się, spoczywając na dnie naczynia, już od dawna używałem 10% dodatku chlorku sodowego do płynu ustalającego. W takim płynie świeży mózg pływa, zatrzymując a względnie przyjmując znowu w zupełności swój kształt naturalny a dopiero po dłuższym czasie nasiąknąwszy tym roztworem opada na dno, lecz wtedy przynajmniej na powierzchni jest już tak twardy że, nie zmienia już kształtu, ani się spłaszcza.

Otóż więc musiałem się liczyć z wpływem chlorku sodowego, zawartego w płynie ustalającym i przekonałem się, że dla należytego zabarwienia preparatów w ten sposób ustalonych trzeba je pozbawić chlorku sodowego, którym są przesiąknięte. W tym celu te preparaty lub mniejsze ich kawałki, przeznaczone do sporządzania skrawków trzymałem w wodzie przekroplonej i zmieniałem ją, dopóki ona nie wyciągnęła z nich chlorku sodowego.

Jeżeli bowiem skrawki zawierają większą ilość chlorku sodowego, wtedy nie można białej substancji doprowadzić do należytego odbarwienia się tak, aby zabarwionemi pozostały tylko niteczki osiowe. Ślady chlorku sodowego, zawarte w skrawkach sprawiają, że rozmaite części skrawka nie barwią się jednocześnie ani też nie odbarwiają się równocześnie, wskutek czego skrawki zaprawione w octanie miedziowym zaraz po ich włożeniu do roztworu karminianu sodowego stają się plamistymi i pozostają plamistymi aż do zupełnego odbarwienia się. W rozmaitych częściach takich preparatów znajdujemy rozmaite okresy reakcyi (a więc rozmaite zabarwienia). Nie może więc być mowy o należytem osiągnięciu pewnego pożądanego wyniku barwienia.

Użycie chlorku sodowego, jako dodatku do płynu ustalającego, wywiera na preparaty poniekąd także trwały wpływ, którego nie można usunąć przez wypłukanie preparatów w wodzie. Zauważyłem mianowicie barwiąc skrawki, zaprawione w octanie uranowym, tylko tak długo, aby zabarwiła się wyłącznie istota szara, że wyniki są odmienne, zależnie od tego, czy do płynu ustalającego był dodany chlorek sodowy, albo też nie. W preparatach mózdzku, ustalonych w roztworze aldehydu mrówkowego, bez dodatku chlorku sodowego, a następnie zaprawionych octanem uranowym, w roztworze karminianu sodowego cała kora barwi się jednostajnie, podczas gdy w preparatach, ustalonych w aldehydzie mrówkowym z dodatkiem chlorku sodowego, warstwa ziaren (głębsza) barwi się silniej od warstwy molekularnej. Chlorek sodowy wywiera więc wpływ, w tym przypadku pożądanym.

Oddziaływanie płynu ustalającego wywiera na preparaty bardzo znaczny wpływ. Stwierdziłem mianowicie, że nie można otrzymać zadowalniającego zabarwienia niteczek osiowych, jeżeli płyn, w którym rdzeń lub mózg był ustalony, oddziaływał kwaśno.

W tym względzie pierwsze spostrzeżenia uczyniłem wspólnie z demonstratorem zakładu p. Alfredem Burzyńskim jeszcze w roku 1898. Zastanowiło nas, że od jakiegoś czasu preparaty, zwłaszcza ośrodków nerwowych, nie twardniały należycie w roztworach *Formolu* z fabryki Mercka w Darmstadzie, tak rychło jak dawniej i przekonaliśmy się, że ten formol nie miał tak silnie ostrego zapachu jak dawniej; pokazało się, że oddziaływanie jego było kwaśne. Gdyśmy przez dodanie odpowiedniej ilości ługu potasowego zobojętnili ten formol, albo nawet doprowadzili do oddziaływania słabo alkalicznego, wtedy miał on zapach tak samo ostry jak formol dawniejszy, a na preparaty działał tak samo energicznie jak dawniejszy. Odtąd postanowiliśmy, każdą flaszkę formolu przed użyciem najpierw zobojętniać przez dodanie odpowiedniej ilości ługu potasowego. Taki zobojętniony formol służył niezawodnie do ustalenia tego rdzenia, z którego powiodło mi się 28. maja 1898 otrzymać preparaty z wyłącznym zabarwieniem niteczek osiowych.

Obecnie przekonawszy się, że w preparatach, ustalonych w roztworach aldehydu mrówkowego oddziaływających kwaśno nie można w zadowalniający sposób zabarwić niteczek osiowych, do płynu ustalającego dodaję 2% dwuwęglanu sodowego, który sprawia, że płyn ten pomimo użycia formolu kwaśno oddziaływającego ma oddziaływanie obojętne lub bardzo słabo alkaliczne.

Formalina, której dostarcza fabryka akcyjna (dawniej Scheringa), oddziałuje prawie obojętnie, więc może i bez dodatku dwuwęglanu sodowego nadawać się do sporządzania płynów ustalających ośrodki nerwowe w sposób pożądanym.¹⁾

¹⁾ Nils Sjöbring w rozprawie p. t. *Über das Formol als Fixierungsflüssigkeit* (Anatom. Anzeiger, Bd XVII. Nr. 16 i 17 z 31. marca 1900) zwraca uwagę na tę okoliczność, że

Następnie należy uwzględnić wpływ rozmaitych czynników i odczynników na preparaty już ustalone.

Nawet wpływ wody przekroplonej może być korzystny lub szkodliwy. Już wyżej zaznaczyłem, że preparaty ustalone w płynie zawierającym chlorek sodowy musiałem płukać w wodzie przekroplonej. Kawałki rdzenia lub mózgu, ustalonego w płynie formaldehydowym, można we wodzie przekroplonej trzymać tygodniami i miesiącami, a skrawki z nich otrzymane, zaprawione w octanie miedziowym lub octanie uranowym, barwią się dobrze. Inaczej ma się rzecz, jeżeli gotowe skrawki wrzucamy do wody lub w niej dłuższy czas trzymamy; wtedy bardzo łatwo powstaje zabarwienie plamiste, t. j. niejednostajne działanie zaprawy i barwika na rozmaite części skrawka, podobnie, jak pod wpływem chlorku sodowego, tkwiącego w skrawkach. Podobne działanie ma woda zwykła (wodociągowa).

Z pomiędzy rozmaitych odczynników a mianowicie soli, którymi traktowałem skrawki przed zaprawieniem ich w octanie miedziowym lub octanie uranowym, bardzo znaczny i w danym razie przydatny wpływ wywiera roztwór azotanu potasowego. Wpływu tego, być może, że jeszcze nie zbadałem wszechstronnie i wyczerpująco, sądzący wszakże, że znam go w ogólności dosyć dobrze. Azotan potasowy przyspiesza i ułatwia barwienie się, zwłaszcza istoty białej, a utrudnia i opóźnia odbarwianie się, zwłaszcza niteczek osiowych. Mimo to niteczki osiowe w preparatach, zaprawionych octanem miedziowym, zabarwione roztworem karminianu sodowego, zawierającym nawet kilkanaście procentów octanu potasowego, w tymże roztworze karminowym ostatecznie się odbarwiają, jak wszystkie inne składniki tkaniny. Jeżeli zaś skrawki z zabarwionymi niteczkami osiowymi, z roztworu barwikowego przeniesiemy do 2% lub bardziej nasyconego roztworem azotanu potasowego, to tenże z niteczek osiowych nie wyciąga barwika nawet w ciągu kilku dni, podczas gdy we wodzie przekroplonej albo w słabszych roztworach azotanu potasowego niteczki osiowe zwolna bledną, albo nawet całkiem się odbarwiają.

Azotan potasowy można przeto zastosować korzystnie do rozmaitych celów a mianowicie traktując jego roztworem skrawki albo już przed zaprawieniem w soli metalowej, albo opłukując roztworem takim skrawki wyjmo-

zachodzi różnica między działaniem formalu i formoliny na tkaniny. Sj. zaleca jako płyn do ustalania tylko formol z fabryki w Höchst. Nasuwa mi się myśl, że stwierdzona przez Nils Sjöbringa różnica w działaniu formaliny a formolu może być następstwem różnicy w oddziaływaniu tych dwóch wyrobów fabrycznych. Wedle moich doświadczeń aldehyd mrówkowy w płynie oddziaływającym obojętnie (lub słabo alkalicznie) lepiej nadaje się do ustalenia, podczas gdy Nils Sjöbring zaleca formol. Może być, że formol z fabryki w Höchst, którego używał Sj. ma inne oddziaływanie niż formol z fabryki Mercka, a może być także, że Sj. otrzymywał formalinę oddziaływającą kwaśno.

wane z zaprawy, albo też dodając azotanu potasowego do roztworu karminianu sodowego, służącego do barwienia i odbarwiania skrawków a wreszcie opłukując skrawki w roztworze azotanu potasowego.

Jako praktyczne wyniki moich dotychczasowych doświadczeń nad barwieniem preparatów ośrodków nerwowych, zaprawionych octanami metali ciężkich, mogę obecnie podać następujące sposoby barwienia:

I. Wyłączne zabarwienie istoty szarej można otrzymać w rozmaity sposób, używając do zaprawy octanu miedziowego lub octanu uranowego, a do barwienia słabego roztworu karminianu sodowego w wodzie przekrojonej (0.1% do 0.3%).

Jako najprostszy i najpewniejszy sposób mogę zalecić następujące postępowanie:

Rdzeń pacierzowy lub mózg ustalają się w 5% do 10% aldehydu mrówkowego. Kwaśne oddziaływanie roztworu ustalającego nie jest przeszkodą dla otrzymania dobrych preparatów. Radziłbym wszakże ustalać przedmioty w płynie zawierającym na 100 cz. wody przekrojonej 2 cz. dwuwęglanu sodowego i 5 cz. aldehydu mrówkowego (t. j. 12.5 cz. formolu). Po 4 do 10 dniach preparaty można krajać, albo z wolnej ręki, albo przy pomocy mikrotomu do zanurzania (n. p. Frommego). Chcąc otrzymać cieńsze skrawki używam mikrotomu saneczkowego z przyrządem do zamrażania za pomocą eteru. Nóż ustawiam poprzecznie tak, jak przy krajaniu preparatów zatopionych w parafinie. Najlepiej krajać się preparaty ustalone w płynie wyżej wskazanym przy temperaturze -10° do -15°C , co można łatwo kontrolować wprowadzając gałkę cieplomierza do wnętrza puszek, w których mieści się rozpylacz dla eteru, przez jeden z otworków bocznych tej puszki.

Skrawki na ten cel służące nie koniecznie muszą być cienkie. Najlepiej nadają się do tego skrawki 100 μ . grubości. Można wszakże barwić skrawki na kilka milimetrów grube.

Skrawki w stanie zamrożonym w trąbkę zwinięte zdejmuję z noża pędzlem zwilżonym i wrzucam do tego samego płynu, w którym rdzeń lub mózg był ustalony. Po ukończeniu krajania, skrawki przenosi się do wody przekrojonej a po kilkunastu minutach (lub nawet po kilku godzinach) do roztworu zawierającego na 100 cz. wody przekrojonej 1 cz. octanu uranowego i 1 cz. kwasu octowego stężonego.

Po kilkunastu a nawet już po kilku minutach skrawki około 100 μ . do 200 μ . są dostatecznie zaprawione; wkładam je wprost z roztworu uranowego (bez opłukiwania w wodzie) do 0.25% wodnego roztworu karminianu sodowego. Octan uranowy, którym skrawek jest przesiąknięty sprawia ciemne obłoczki w roztworze karminowym, które przy zamieszaniu rozpuszczają się, przy czem roztwór karminianu staje się żywiej czerwonym. Zaraz w pierwszej chwili po wrzuceniu skrawka do barwiku, zaczyna się barwić szara istota,

a po kilkunastu lub kilkudziesięciu sekundach zabarwienie dochodzi do najwyższego stopnia nasycenia, podczas gdy istota biała wcale jeszcze się nie zaczyna barwić. Można cały przebieg reakcyi śledzić, przechylając miseczkę zawierającą barwik, a skrawek przytrzymując igielką szklaną (prętem szklanym na końcu cienko wyciągniętym i zatopionym) tak, aby płyn skrawek na przemian oblewał i z niego odpływał.

Gdy zabarwienie wydaje się dostatecznem, skrawek wyjmuje się, opłukuje we wodzie przekroplonej, następnie wkłada do absolutnego alkoholu, chloroformu i zachowuje w balsamie kanadyjskim.

Zdarza się niestety, że wśród białej istoty na skrawkach przy barwieniu powstają plamy lub pręgi blado różowe, które psują całą świetność wyniku. Mam przekonanie, że plamy takie są następstwem mechanicznych uszkodzeń, które działały na skrawki w czasie, gdy leżały w wodzie przed zaprawianiem ich w octanie uranowym, pręgi zaś najoczywściej są śladami dotknięć igielką przy przenoszeniu skrawków z wody do roztworu uranowego. Jak długo skrawki leżą w płynie ustalającym, zdaje mi się, że takie dotknięcia im nie szkodzą, równie jak wtedy, gdy już są zaprawione octanem uranowym i w nim stwardniały.

Jeżeli się uniknie wspomnianych plam w białej substancji, wyniki tego nader prostego i łatwego postępowania są świetne a szara substancja jest jaskrawo karminem zabarwiona i to w rozmaitych odcieniach (n. p. najintensywniej barwią się substancje kleiste, jądro zębate oliwy, jądro zębate mózdzku), podczas gdy biała substancja pozostaje zupełnie bezbarwną.

Zupełnie takie same wyniki otrzymać można, jeżeli zamiast karminianu sodowego użyje się wodnego roztworu hematoksyliny (0.1%) bez żadnych dodatków: szara istota przybiera barwę fiołkową w rozmaitych odcieniach.

Na preparatach w ten sposób otrzymanych, istota szara uwidoczniła jest tak wyraziście i jaskrawo, jak tylko można marzyć i sobie życzyć. Preparaty takie nadają się doskonale do badania gołym okiem, lupą i słabszymi powiększeniami mikroskopowymi, dla demonstracji i studyowania rozmieszczenia szarej istoty i rozmaitych jej modyfikacji w ośrodkach nerwowych. Nie mniej przydatne są takie (zwłaszcza karminowe) preparaty do zdjęć fotograficznych w powiększeniu kilkakrotnem lub kilkunastokrotnem. Fotogramy takie sporządzam za pomocą skioptikonu (przrządu do powiększenia fotografii). W miejscu przeznaczonem dla negatywu (z którego ma być otrzymana fotografia powiększona) umieszcza się preparat i otrzymuje negatyw kilkakrotnie powiększony, jeżeli na ekranie była przymocowana kaseta z czułą płytą. Z tego negatywu przez ponowne powiększenie można otrzymać dodatnie obrazy w rozmiarach takich, że można ich używać jako tablice ścienne.

Do badania mikroskopowego przy pomocy silniejszych powiększeń i do studyowania drobniejszych szczegółów budowy histologicznej preparaty te mojem zdaniem się nie nadają. Zabarwienie w nich przy silniejszych powiększeniach

okazuje się rozlanem, mdłym i stosunkowo bladym, jakkolwiek granice szarej istoty względem białej są nader ostre. Można stwierdzić, że jest zabarwiona neuroglia (wszystkie jej składniki) tudzież komórki gangliowe i ich dendryty. Zabawienie to dotyczy wszakże tylko powierzchownych warstw preparatu i nie rozciąga się w głąb; nawet komórki gangliowe nie są zabarwione na wskrós, lecz tylko jakby pomalowane na swej powierzchni. Aby bowiem uzyskać tego rodzaju zabarwienie, jak mają te preparaty, trzeba sprawę barwienia przerwać już w samych początkach t. j. nim barwik zupełnie nasycił te części, które spotyka na powierzchni preparatu; w głąb barwik mógłby być działać dopiero wtedy, gdyby powierzchowne części szarej istoty już przestały go zabierać, lecz wtedy jużby się barwiła także istota biała.

Można otrzymać także skrawki (100 μ grube) zabarwione tylko na jednej ze swych powierzchni, jeżeli obok skrawka zaprawionego w oście urowym a po odlaniu roztworu urowego przylegającego do dna miseczki, nalejemy barwiku tak, aby po przychyleniu miseczki, gdy płyn dojdzie do skrawka, tenże wydostał się od razu na powierzchnię roztworu karminowego i na niej pływał, co zresztą wcale nie trudno osiągnąć.

Jeżeli chodzi o zabawienie powierzchni bardzo grubych skrawków (n. p. na jeden lub kilka milimetrów) to trzeba je dłużej pukać we wodzie a następnie także dłużej (kilka godzin i więcej) pozostawić w roztworze octanu urowego.

II. Zabawienie (przeważnie) neuroglii w substancji szarej i w substancji białej otrzymywałem w rozmaity sposób, na przykład, jeżeli skrawki rdzenia lub mózgu ustalonego w aldehydzie mrówkowym, otrzymane przy zamrożeniu, w stanie zamrożonym wprost wrzucałem do roztworu octanu urowego, albo zaprawiałem je w oście urowym opłukawszy je przedtem w roztworze azotanu potasowego a następnie barwiłem w roztworze karminianu sodowego, do którego był dodany azotan potasowy.

Preparaty takie okazują także dosyć dobrze różnicę między szarą a białą istotą. Biała istota jest znacznie słabiej zabarwiona niż szara, a mianowicie widać w istocie białej już gołym okiem lub lupą, wszystkie przegrody neurogliowe. Przy pomocy mikroskopu można stwierdzić, że zabarwione są dosyć wyraziście pajęczynowate komórki neuroglii ze swoimi wypustkami i to znowu tylko w powierzchownych warstwach preparatu. Jeżeli skrawek nie pozostawał zaadto dłużej w karminie, wtedy niteczki osiowe wcale nie są zabarwione.

Mam przekonanie, że takie zabawienie i tym podobne, które, stosując znalezioną przezemnie zasadę barwienia, można otrzymać, będą mogły posłużyć do rozjaśnienia budowy neuroglii. co do której zdania są podzielone (zapatrywania Ranvier'a i Weigert'a z jednej, a Golgiego, Köllikera i innych z drugiej strony).

III. Nasycone zabarwienie istoty, białej przy prawie zupełnem odbarwieniu istoty szarej, otrzymywałem nieraz i to w rozmaity sposób, zamierzając osiągnąć wyłączne zabarwienie niteczek osiowych. W pewnych warunkach, w skrawkach zaprawionych czy to octanem miedziowym czy też octanem uranowym, w białej istocie oprócz niteczek osiowych barwią się składniki histologiczne wypełniające przestrzenie pomiędzy włóknami nerwowymi (neuroglia) tak intensywnie i trwale, że gdy trzymałem takie preparaty dłuższy czas w roztworze karminianu sodowego, w istocie szarej już wszystko się było odbarwiło, a nawet i niteczki osiowe w białej substancji zaczynały blednąć, podczas gdy reszta białej istoty jeszcze ciągle zatrzymywała intensywne zabarwienie.

Preparaty takie są niejako negatywami w stosunku do preparatów opisanych pod I. z wyłącznem zabarwieniem istoty szarej. Uważałem je jako »nieudane wyniki barwienia», zwłaszcza że do celów mikroskopowych nie są przydatne, nie zadawałem więc sobie trudu, aby szczegółowo stwierdzić wszystkie warunki, od których zależy taki wynik barwienia. Zdaje mi się wszakże, że takie uporczywie trwałe zabarwienie neuroglii w białej istocie sprawia głównie azotan potasowy, jeżeli do jego roztworu włożymy skrawki przed zaprawieniem ich w octanie miedziowym lub w octanie uranowym, a po zaprawieniu używamy roztworu karminianu sodowego zawierającego 2% lub więcej azotanu potasowego.

IV. Wyłączne zabarwienie niteczek osiowych w istocie białej i szarej zależnem jest od dopełnienia przedewszystkiem dwóch warunków a mianowicie: a) rdzeń musi być ustalony w roztworze aldehydu mrówkowego nie oddziaływającym kwaśno, a więc zobojętnionym n. p. za pomocą dwuwęglanu sodowego; b) skrawki muszą być zaprawione w roztworze octanu miedziowego niezawierającym ani śladu wolnego kwasu octowego. Oprócz tego należy używać do barwienia i odbarwienia roztworu karminianu sodowego zawierającego azotan potasowy, a po wyjęciu z tego roztworu skrawki płukać w roztworze azotanu potasowego.

Obecnie dla otrzymania wyłącznego zabarwienia niteczek osiowych mogę zalecić następujące postępowanie, wypróbowane głównie na rdzeniu pacierzowym i rdzeniu przedłużonym.

Przy wyjmowaniu i po wyjęciu rdzenia nie należy go opłukiwać wodą, lecz wprost z krwią włożyć do płynu ustalającego, zawierającego na 100 cz. 5 części aldehydu mrówkowego i 2 cz. dwuwęglanu sodowego¹⁾.

¹⁾ Przy sporządzaniu płynu rozpuszczając dwuwęglan sodowy we wodzie (przekropionej) nie należy jej ogrzewać, aby dwuwęglan sodowy się nie rozkładał i nie nadawał płynowi oddziaływania silniej alkalicznego. Do tego roztworu dodaje się odpowiedniej ilości formolu.

Po 4 do 10 dni można już przystąpić do sporządzania skrawków; dłuższy pobyt preparatów w płynie ustalającym nie wywiera szkodliwego wpływu lecz owszem jest korzystny.

Skrawki, które sporządzam za pomocą mikrotomu z przyrządem do zamrażania w sposób wyżej opisany, muszą być cieńsze a mianowicie 20 μ do 30 μ , najwyżej 40 μ . Przytem należy ze szczególną troskliwością starać się o to, aby każdy skrawek był w całej swojej rozciągłości ile możności jak najdokładniej jednakowo gruby.

Skrawki takie w stanie zamrożonym wrzucam do tego samego płynu w którym rdzeń był ustalony; jednakże przekonałem się, że w tym płynie nie mogą one dłuższy czas pozostawać, gdyż wtakim razie reakcja, która zależy na barwieniu się i odbarwianiu pod wpływem roztworu karminianu sodowego, nie odbywa się równocześnie we wszystkich częściach skrawka, czego wynikiem jest, że w pewnych miejscach właśnie niteczki osiowe są najintensywniej zabarwione na bezbarwnem tle, podczas gdy w innych miejscach tego samego sznura pozostają jeszcze zabarwione rozmaite inne składniki tkaniny a znowu w innych miejscach, tuż obok dobrych, już i niteczki osiowe zaczynają się odbarwiać.

Nie powiodło mi się znaleźć płynu, w którymby skrawki można bezkarnie trzymać czas dłuższy. Woda przekroplona do tego celu nie nadaje się tak samo, jak rozmaite roztwory solne, których próbowałem; a co najgorzej i czego nie byłbym przypuszczał, nie nadaje się do tego nawet ten sam płyn w którym rdzeń był ustalony i w którym całe jego kawałki mogą pozostawać długi czas bez szkody.

Także nieodpowiedniem okazało się wrzucanie jeszcze zamrożonych skrawków wprost do roztworu octanu miedziowego. Nie pozostaje zatem nic innego, jak każdy skrawek otrzymany i wrzucony do płynu ustalającego, natychmiast po rozmarznieniu i rozwinięciu się, wydobyć z tego płynu i przenieść do 1% roztworu octanu miedziowego.

W tym roztworze skrawki już po kilkunastu minutach są dostatecznie zaprawione, choć mogą w nim bez szkody pozostawać przez kilka godzin albo nawet kilka dni i dłużej.

Skrawek wyjęty z octanu miedziowego opłukuję w 2% roztworze azotanu potasowego w miseczce porcelanowej, w której też wnet po odlaniu tego roztworu oblewam go kilkoma kroplami roztworu barwiku, zawierającego na 100 cz. wody przekroplonej 1 cz. karminianu sodowego i 2 cz. azotanu potasowego.

Prawie natychmiast po obłaniu tym barwikiem barwi się cały skrawek a mianowicie zarówno istota biała jak istota szara; szara istota wszakże odrazu barwi się silniej. Biała istota powoli barwi się również coraz silniej, tak, że po pewnym czasie cały skrawek wydaje się zabarwionym jednostajnie.

Potem zaczyna blednąć istota szara i tym sposobem znowu się uwydatniać, a gdy także i biała istota cokolwiek zblednie, czas jest reakcją przerwać, roztwór barwiku odlać lub zebrać małą pipetką, a skrawek opłukać 2% roztworem azotanu potasowego. (W ten sposób można barwienie a względnie już odbarwianie kilkakrotnie przerywać, skrawek opłukiwać w 2% roztworze azotanu potasowego i w razie potrzeby znowu oblewać roztworem karminowym, aż się osiągnie pożądaný okres reakcji). Zresztą trzeba się praktycznie wprawić w tem, aby z wejrzenia skrawka ocenić, czy wyłączone zabarwienie niteczek osiowych jest już osiągnięte, aby więc w roztworze karminowym skrawek nie trzymać za krótko ani za długo.

Cały proces barwienia i odbarwiania trwa kilka albo kilkanaście minut. Zależy to wszakże od grubości skrawka, tak, że czasu potrzebnego do osiągnięcia pożądanego okresu reakcji nie można w ogóle ani też z góry dokładnie oznaczyć.

Sposób ten otrzymania zabarwienia niteczek osiowych jest więc dosyć prosty a przynajmniej nierównie prostszy aniżeli sposób Upsona;¹⁾ wymaga jedynie pewnej troskliwości przy sporządzaniu skrawków, tudzież uwagi podczas stosowania roztworu karminianu sodowego i pewnej wprawy w ocenianie, kiedy działanie tego roztworu należy przerwać i skrawek oblać 2% roztworem azotanu potasowego.

W tym roztworze należy skrawek pozostawić tak długo, jak długo jeszcze oddaje barwiku, ewentualnie roztwór raz lub dwa razy zmienić. To płukanie nie trwa również dłużej nad kilkanaście minut.

Opłukany skrawek mający barwę wiśniową lub nawet fiołkową wkłada się wprost do absolutnego alkoholu, następnie do chloroformu i balsamu kanadyjskiego.

Winieniem jeszcze zauważyć, że dopiero kropla balsamu kanadyjskiego, którą obłany skrawek na szkiełku przedmiotowym zwykłym ogrzewać lekko nad małym płomieniem gazowym celem wypędzenia chloroformu, wyciąga z preparatu jakieś połączenie miedziowe, rozpuszczalne w balsamie, które barwi ten balsam pięknie błękitno. Jest więc rzeczą pożądaną balsam zmienić, co uskutecznia się w ten sposób, że po ostudzeniu, na skrawek zawarty w balsamie nalewa się cokolwiek chloroformu tak, aby skrawek można zdjąć ze szkiełka, opłukać w chloroformie, poczem on przybiera barwę żywo karminowo-czerwoną. Teraz dopiero skrawek zachowuje się w nowej kropli świeżego balsamu.

¹⁾ Zob. rozprawę Merciera, *Die Upson'schen Methoden der Achsencylinder — und Zellen — (Goldfärbung)* w *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie* T. VII. (1890) str. 474 do 479.

Jestem skłonny sądzić, że balsam kanadyjski (a także już chloroform) rozkłada karminian miedziowy zawarty w preparacie i nadający barwę niteczkom osiowym, tak, że potem pozostaje w preparacie a względnie w niteczkach osiowych mniej więcej czysty kwas karminowy.

W preparatach w ten sposób sporządzonych wszystkie niteczki osiowe od stosunkowo grubych aż do niezmiernie cienkich są uwidocznione przez swoje zabarwienie karminowe w najwyższym stopniu nasycone. Zresztą wszystkie inne składniki tkaniny są albo zupełnie bezbarwne (jak n. p. jądra komórkowe) albo co najwyżej różowe, o ile się nie całkiem zupełnie odbarwiły. Najtrudniej mianowicie uzyskać zupełne odbarwienie się substancyj kleistych, a także w sznurach piramidowych pozostaje często odcień różowy. Jeżeli zaś te partye doprowadzimy do zupełnego odbarwienia, natenczas zwykle przekonamy się niestety, że w niektórych innych miejscach już niteczki osiowe cokolwiek zbladły, a niektóre nawet zupełnie się odbarwiły.

Może być, że dalsze moje usiłowania doprowadzą do sposobu umożliwiającego zupełne odbarwienie wszystkich innych składników rdzenia, podczas gdy wszystkie niteczki osiowe zatrzymają w całej pełni swoje jaskrawe zabarwienie. Jestem przekonany, że ten prosty sposób barwienia niteczek osiowych znajdzie szerokie zastosowanie, jako nierównie jaśniej uwidoczniający rozmieszczenie i przebieg włókien nerwowych w ośrodkach nerwowych, aniżeli obecnie używane sposoby barwienia osłonek myelinowych wedle zasady Weigerta. Po zabarwieniu niteczek osiowych, każde włókno nerwowe widzi się z osobna, choćby nawet wchodziło w skład wiązki włókien licznych i ściśle do siebie przylegających. Nawet najcieńsze włókna, jakie napotykamy w istocie szarej rdzenia, w istocie białej móżdżku, tudzież w wielkiej liczbie pomiędzy grubemi włóknami sznurów piramidowych, przez zabarwienie wyłączne niteczek osiowych występują nader wyraziście.

W końcu muszę podnieść zaletę tego sposobu, wspólną ze wszystkimi zabarwieniami karminowemi, a mianowicie trwałość zabarwienia.

