

Institutul de anatomie și chirurgie operatorie a I. M. F. Tg.-Mureș.
Conducător: Conf. Maros Tibor

METODA MODIFICATĂ DE IMPREGNARE ARGENTICĂ PENTRU EVIDENȚIEREA ELEMENTELOR NERVOASE

(Comunicare prealabilă)

Lázár László

Importanța cunoștințelor morfologice referitoare la sistemul nervos a fost deseori accentuată de marele fiziolog *Pavlov*. Explicația numeroaselor fenomene observate de către fiziologi, s-a dat prin clarificarea bazei morfologice. Și astăzi mai cunoaștem încă multe fenomene patologice și fiziopatologice care au în mod evident o bază nervoasă fără însă ca morfologia lor să fie lămurită. Cu toate că, în ultimii ani, numeroși cercetători au studiat temeinic inervația, mai cu seamă, a organelor interne, a vaselor sanguine ș.a.m.d., totuși și în acest domeniu, mai sînt încă multe probleme nerezolvate. Altfel cele câteva fapte amintite mai sus precum și activitatea plină de avînt a institutelor de cercetări cerebrale arată că studiul morfologiei sistemului nervos este astăzi, poate mai actual ca oricînd. Așa dar, dezvoltarea microtehnicii necesare pentru examinarea morfologică a sistemului nervos nu înseamnă nici decum pierdere de vreme, mai ales dacă aceasta urmărește facilitarea unor metode mai greu de aplicat. Una dintre metodele cele mai grele dar și folositoare ale microtehnicii nervoase este impregnarea argentică, a cărei utilizare s-a dovedit a fi deosebit de rodnică în domeniul neuromorfologiei. În activitatea microtehnică obișnuită, metodele de impregnare argentică sînt greu aplicabile.

deoarece pentru a le însuși complet e nevoie de mult timp, iar rezultatele obținute nu sînt întotdeauna sigure. Sînt mai bine de o sută de ani de cînd *Stilling* a examinat mîduva cu ajutorul metodelor microtehnice și mai bine de 80 de ani, de cînd *Recklinghausen* a încercat, să pună în evidență fibrele nervoase cu ajutorul sărurilor argint, — și cu toate acestea, nici astăzi nu există o metodă de impregnare argentică, a cărei aplicare să fie posibilă și în laboratoarele provinciale de anatomie patologică.

În anul 1886 a devenit cunoscută metoda cromului argintat a lui *Golgi*, prin care se poate observa celula nervoasă împreună cu toate prelungirile ei. Metoda lui *Golgi* a oferit un punct de sprijin teoriei neuronice a lui *His* tocmai prin faptul că a adevărit unitatea morfologică a celulei nervoase și a fibrelor nervoase. Dar, cu metoda lui *Golgi* nu se pot observa toți neuronii: fiecare bucată examinată prezintă în chip rapsodic numai cîteva celule nervoase; în schimb e adevărat că pe acestea le colorează împreună cu prelungirile lor. Din cauza particularităților ei pe care le-am amintit, metoda lui *Golgi* nu este aplicabilă în examenele neurohistologice curente (fiindcă nu evidențiază toți neuronii), iar astăzi nu se întrebuintează, propriu zis, decît în cercetările cerebrale.

Concomitent cu metoda lui *Golgi* a devenit cunoscută și metoda albastrului de metil a lui *Ehrlich*, care însă poate fi aplicată numai în anumite condiții. Ea nu este aplicabilă în examenele anatomiche ale materiilor vechi, fixate în formalină.

În practică a dat rezultate bune și s-a răspândit mai cu seamă metoda lui *Cajal* și *Bielschowsky*. Metoda lui *Cajal*, cunoscută încă din anul 1903, are meritul că evidențiază toate elementele nervoase ale sistemului nervos. Datorită impregnării în bloc, ea prezintă marele avantaj că elementele nervoase pot fi urmărite în serie; neajunsul ei are constanță în faptul că nu toate blocurile reușesc, iar în acest caz unele din ele se pierd. Cea mai eficientă modificare adusă metodei lui *Cajal* se leagă de numele lui *Troicki*; dar nici prin aplicarea acestei modificări nu reușește fiecare bloc (impregnarea se efectuează strat de strat) și astfel o parte a materialului e inutilizabilă.

Metoda lui *Bielschowsky* și modificările ei (*Gros-Schultze*, *Lavrantiev*) prezintă avantajul că fiind o impregnare a fiecărei secțiuni în parte, chiar în caz de nereușită nu se pierde tot materialul așa cum se întâmplă la impregnarea blocului. Uneori însă, nici această metodă și modificările ce i s-au adus, nu reușesc, chiar dacă se întrebuițează substanțe chimice „proanalize” și nu reușesc sigur întrebuițând substanțe chimice impure.

Acestea sînt procedee foarte exigente, atît în ceea ce privește substanțele chimice cît și durată. Pentru a le putea însuși e nevoie de mult timp, mai ales dacă lipsesc substanțele chimice sigure. În afară de cele amintite, metodei lui *Bielschowsky* i s-au mai adus numeroase modificări, dar fiecare din ele a păstrat într-o măsură mai mare sau mai mică deficiențele inițiale. Cele mai multe din aceste modificări solicită o experiență personală de așa natură, încît la drept vorbind, numai autorul lor le poate aplica cu succes.

Pînă azi, metoda cea mai sigură și cea mai răspîndită pentru evidențierea fibrelor nervoase este impregnarea cu argint. Dar toate procedeele, de impregnare sînt labile, nici unul nu ne dă o imagine permanentă, iar efortul de a le însuși e greu și anevoos, deoarece nici unul din procedeele cunoscute pînă acum nu se poate aplica fără o experiență proprie.

Date fiind aceste cauze, cele mai multe metode de impregnare nu sînt aplicabile în cadrul unei activități histologice curente.

Considerentele amintite mai sus, ne-au îndemnat să prelucrăm un procedeu aplicabil cu substanțe chimice de o calitate variabilă. Imediat am constatat un fapt pe care l-au semnalat și alții, că una din etapele critice le impregnărilor de tip *Bielschowsky* o constituie pregătirea argintului amoniacal. Reacția capricioasă a argintului amoniacal în ce privește precipitarea este cauzată în parte de cantitatea și calitatea substanței reductive ce se introduce prin secțiune. Tratarea ulterioară a secțiunilor impregnate poate să constituie de asemenea, multe surse de erori. Explicația faptului că cele mai multe procedee nu sînt însușite decît în mod anevoios, trebuie căutată tocmai în sursele de erori amintite, iar înlăturarea acestora este foarte grea sau chiar imposibilă.

În cursul aplicării și analizei procedeele de pînă acum am găsit una din sursele de erori esențiale în tratarea anterioară sau ulterioară cu formalină; nu am putut să înlăturăm această dificultate decît lăsînd complet la o parte această fază a impregnării și introducînd reductorul de zahăr recomandat de *Szentpétery*.

Am micșorat sursa de erori rezultată din calitatea argintului amoniacal transformînd soluția într-un PH aproximativ constant, prin faptul că, după pregătirea soluției, am fixat amoniul rămas disponibil cu ajutorul unui adaos de nitrat de argint.

După aceasta a trebuit să căutăm proporția de amestec optim al argintului amoniacal și a reductorului adică proporția la care argintul se depune în chipul cel mai electiv pe elementele nervoase. Am reușit să obținem această proporție de amestec optim prin aplicarea soluțiilor diluate. În soluțiile diluate precipitarea argintului se efectuează lent, iar reductorul de zahăr contribuie în sine la încetinirea procesului. În felul acesta precipitarea argintului care era pînă acum labilă și greu de dominat poate fi îndrumată într-un sens precis prin excluderea celor două surse de erori amintite, am izbit să înlăturăm frecvența ineficienței de care vorbeam și să facem ca tabloul tisular al impregnării să fie permanent și electiv.

Am intensificat depunerea electivă a argintului pe elementele nervoase, întrebându-
înd acidul arsenic, recomandat de mai
mulți autori (*Lavrantiev, Deinec*), dar nu
ca element de fixare, ci ca material de
inhibare. Orice material, fie cit de vechi
fixat în formol, l-am introdus după pre-
gătirea secțiunilor congelate; într-o baie
de inhibare de alcool cu acid arsenic, și
prin aceasta am ușurat în mare măsură,
impregnabilitatea elementelor nervoase.
Prin urmare, modificarea noastră nu necesi-
tă o substanță de fixare specială. Acest
fapt oferă posibilitatea ca același mate-
rial să poată fi examinat și prin alte pro-
cedee.

Datorită modificării noastre, tratarea
ulterioară cu clorat de aur, pare a fi de
prisos; de aceea nici nu am aplicat-o. În
secțiunile impregnate, oprim reductorul cu
alcool amoniacal, iar tabloul îl fixăm cu
tiosulfat de sodiu. După fixare, secțiunile
le spălate fără deshidratare, le includem
cu sirop gumos, după procedeul lui *Apáthy*
ceea ce nu are nici un efect dăunător a-
supra preparatelor fixate. Înălăturarea des-
hidratării necesare fixării în balsam *Ca-*
nada, a făcut ca tabloul microscopic să
fie mai natural, deoarece elementele celu-
lare nu se zăbiresc, ceea ce de altfel nu se
poate obține decât printr-o tratare ulte-
rioară specială.

Etapele procedurii noastre, descrise mai
sus în linii generale, sînt următoarele:

1. Fixarea în formol (5—10%).
2. Spălarea în apă de robinet timp de
cel puțin 2 ore.
3. Pregătirea secțiunilor congelate, avînd
o grosime de 10—20 microni.
4. Spălarea secțiunilor în apă distilată
primită timp de 20—30 de minute.
5. Inhibarea într-un amestec de soluție
de acid arsenicos și alcool de 96° în pro-
porție de 1:5, timp de 24 ore (sau chiar
săptămîni).
6. Spălarea cu apă distilată primită.
7. Impregnarea în soluție de nitrat de
argint 20%, timp de 1—24 ore. Durata
optimală 1 oră.
8. Clătirea în apă distilată timp de ci-
teva minute.
9. Developarea în soluțiile A și B, pe
care le vom descrie mai jos.
10. Spălarea în alcool amoniacal (alcool
de 96° cu 4—5 picături de amoniu)

11. Spălarea în apă distilată.
12. Fixarea în soluție 2,5% de tiosulfat
de sodiu, timp de citeva secunde.
13. Spălarea repetată în apă distilată,
timp de o oră.

14. Includerea cu sirop gumos tip *Apáthy*.
Pentru dezvoltare, întrebuițăm ameste-
cul proaspăt pregătit al soluțiilor indicate
cu inițialele A și B.

Soluția A se pregătește în felul următor:
În 10 cm³ soluție de nitrat de argint de
10%, introducem atîtea picături de amo-
niu concentrat, pînă cînd soluția, la înce-
put tulbură, începe să se limpezească. Apoi
introducem 5 picături dintr-o soluție de
10% hidroxid de sodiu; pe urmă, în solu-
ția ce s-a precipitat din nou, pipetăm ia-
răși picături de amoniu, pînă se limpe-
zește. După aceea, din soluția de nitrat de
argint 10%, introducem atîtea picături pi-
nă cînd amoniul disponibil se fixează, iar
soluția devine opalescentă.

Soluția B (după *Szentpétery*) se pregă-
tește astfel:

La cantitatea de 74 cm³ de apă distilată,
adăogăm 8 g zahăr, 17,5 cm³ alcool de 96°
și 0,3 cm³ acid nitric concentrat. Această
soluție poate fi folosită numai după 48 de
ore dar se păstrează bine chiar timp de
un an. Amestecul soluțiilor A și B, se
pregătește imediat înainte de întrebuița-
re, în felul următor: diluăm 3 cm³ din
soluția A cu 3—6 cm³ de apă distilată,
apoi adăogăm 10 picături din soluția B,
și amestecăm imediat. După ce am ames-
tecat, introducem secțiunile impregnate și
spălate cu apă distilată, în această solu-
ție și amestecăm din nou împreună cu
secțiunile. De îndată ce observăm că au
primit o nuanță de galben închis, le scoa-
tem din soluția de dezvoltare și, după ce
le clătăm în apă distilată, le introducem în
alcool amoniacal, așa cum am precizat la
punctul 11.

Amestecul de dezvoltare se poate întrebui-
ța o singură dată, apoi vasul trebuie
spălat. Avantajele modificării noastre, în
comparație cu procedeele de pînă acum,
sînt următoarele:

1. Modificarea da un tablou sigur și
permanent mai cu seamă în sistemul ner-
vos periferic; fiecare secțiune este identi-
că în cazul în care soluția de dezvoltare
a fost diluată în mod identic. Aceasta

face ca ea să fie aplicabilă atât la efectuarea examenelor histologice curente, cât și la pregătirea seriilor didactice.

2. În ce privește substanțele chimice, ea este puțin pretențioasă. În timp ce alte procedee sînt aplicabile numai cu condiția ca substanțele chimice să poarte marca de fabricație.

3. Poate fi însușită ușor, deoarece nu cere din partea celor ce o aplică experiențe personale deosebite.

Din cauza faptului că procedeul nostru de impregnare este simplu, sigur și poate fi însușit fără greutate, el ușurează activitatea acelor care se ocupă cu histologia și histopatologia sistemului nervos, căci din motive lesne de înțeles, aceștia re-

nunță să aplice metodele de impregnare argentică, exigente și greu accesibile.

Sîntem convinși că procedeul nostru poate fi însușit cu ușurință de oricine, și dat fiind că e foarte puțin pretențios, există posibilitatea să se aplice în orice laborator provincial de anatomie patologică. Credem că nu poate fi decît în avantajul cadrelor de specialitate care se ocupă cu problemele de histopatologie, dacă alături de metodele histopatologice obișnuite vor aplica la cercetarea sistemului nervos și acest procedeu de impregnare argentică, mai cu seamă că aceasta nu înseamnă pentru ele o sarcină mai mare decît celelalte procedee curente.

Primită la redacție: la 28 februarie 1956.

