Lezioni Microscopiche

J. Borg

Volume 24

Appunti
per la preparazione
di sezioni al microscopio.

G Borg

Mounting Solutions.

1. Saline Solution. – A 0·6 to 0·9 per cent. solution of common salt is used in place of serum for mounting fresh tissues for immediate examination.

2. Glycerine, diluted with an equal quantity of water. The cover glass may be fixed by gold-size.

3. Canada balsam, from which the volatile oils have been driven off by heat, dissolved in xylol.

4 Acetate of potassium, a nearly sa-rated solution. This is the best medium for osmic preparations and for iodine stained liver, showing glycogen within the cells. The cover-glass may be fixed by soluble glass or by gold size.

Metodi Generali per la preservazione e l'indurimento di tessuti ed organi.

I fluidi che sono più in uso sono i seguenti:

1) Alcool (75 per cent. a assoluto).

2) Fluido di Carnoy (alcool assoluto 60 c.c., cloroformio 30 c.c., acido acetico glaciale 10 c.c.).

3) Formol o formalina che una soluzione di formaldehyde o formaldeide al 40 per cento. Questo formol si diluisce con da 9 a 99 parti di acqua.

4) Sublimato corrosivo (soluzione satura in acqua o in alcool).

5) Acido cromico in soluzione al 1 in 200, o al 1 in 500, alla quale si aggiunge l'acido acetico glaciale nella proporzione di 2 parti di acido acetico a 1000 parti di soluzione cromica.

6) Soluzione satura di acido picrico, semplice

semplice o coll'aggiunta di 2 parti di acido solforico o nitrico a 1000 parti di soluzione.

7) Il fluido di Mann, che è una miscela di parti uguali di soluzioni acquose sature di sublimato corrosivo e di acido picrico.

8) Soluzione di acido osmico all'uno per cento.

9) Soluzione di bicromato di potassa al 3 per cento, al quale si può aggiungere acido acetico glaciale fino al 5 per cento, per affrettare l'indurimento.

10) Il fluido di Müller, formato da $2\frac{1}{2}$ parti di bicromato di potassio, 1 parte di solfato di sodio, in 100 parti di acqua.

11). Il fluido di Zenker, che è il fluido di Müller coll'aggiunta del 5 per cento

di cloruro mercurico (sublimato corrosivo), al quale poi si aggiunge un poco di acido acetico al momento quando se ne fa uso.

12). Miscele in varie proporzioni del fluido di Müller e di una soluzione di acido osmico al 1 per cento.

Se è possibile, il fluido usato per l'indurimento sarà iniettato nei vasi sanguigni previa lavatura con acqua normale salina tiepida. Se questo non è possibile, si deve fare uso soltanto di piccoli pezzi di tessuto, e sempre una gran quantità di liquido di indurimento.

Il fluido più usato è la formalina o formol, in una miscela di 2 a 5 parti in 100 parti di acqua. Questa miscela penetra facilmente nei tessuti e li indurisce presto.

Per

Per conservare la struttura delle cellule e dei nuclei, si usa la miscela del Flemming, la quale consiste di 15 parti (p. volume) di una soluzione all'uno per cento di acido cromico, di 4 parti per volume di una soluzione al 2 per cento di acido cromico, ed una parte o volume di acido acetico glaciale. Questa miscela talvolta si diluisce con due a cinque volte il volume di acqua, prima di usarla. Vi si mette il tessuto per tre o quattro giorni, poi si lava per varie ore in acqua corrente, e poi messo nello alcool. Il fluido di Carnoy ha anche esso una azione molto rapida, ed è ottimo per conservare la struttura della cellula e le diverse fasi della cariocinesi.

I tessuti da essere induriti nello

alcool si pongono immediatamente in alcool metilico forte, o meglio in alcool assoluto, ma per alcuni tessuti è meglio incominciare con alcool al 50 per cento, e poi passare i pezzi ~~per gradi~~ in ~~di~~ alcool di più alto grado fino all'assoluto, lasciandoli per parecchie ore in ciascuno. Dopo questo trattamento i tessuti sono pronti pel taglio, ma si possono conservare indefinitamente immersi nell'alcool assoluto.

Organi che contengono molto tessuto fibroso, come la pelle e i tendini, diventano troppo duri pel taglio se sono messi in alcool di grado superiore al 80 o al 90 p. cento. L'alcool si usa dopo tutti gli altri reagenti usati per l'indurimento, perchè in grazia del suo

del suo potere disidratante elimina dai tessuti ogni traccia di acqua, prima della loro immersione nella paraffina.

Il percloruro di mercurio o sublimato corrosivo indurisce i tessuti assai rapidamente, ma all'alcool che si usa dopo l'immersione nella soluzione al sublimato, si deve aggiungere un po' di tintura di iodo, per eliminare l'eccesso di sublimato, eccetto per l'alcool finale, che deve essere usato sempre puro.

Si può indurire istantaneamente molti tessuti mettendoli per qualche minuto nell'acqua bollente, e poi mettendoli in alcool di crescente grado, come prima. Questo metodo non si può molto bene usare per tessuti

glandolari.

Per l'indurimento dei tessuti all'acido cromico, bisogna lasciarli in questa soluzione per 7 a 14 giorni. Poi li lavano per alcune ore in acqua corrente, e si mettono in alcool a graduazione crescente per conservarli e completarne l'indurimento, cambiando l'alcool una o due volte.

Per l'indurimento al bicromato di potassio o al fluido di Müller si richiede una immersione di 15 giorni a tre settimane, ma vi si possono lasciare molto più a lungo senza subire alcuna deteriorazione.

Per l'indurimento all'acido picrico basta una immersione di 2, o 3 giorni, poi i tessuti si mettono in alcool, cambiandolo spesso.

Per

Per indurire il cervello e il midollo spinale si richiede una immersione nel fluido di Müller da tre ~~giorni~~ settimane a tre mesi. Si può affrettare l'indurimento col riscaldamento o colla aggiunta di acido acetico, o con una immersione per qualche tempo nella soluzione del Marchi dopo una immersione di 7 a 10 giorni nel fluido del Muller.

Per decalcificare i tessuti ossei, si può usare una soluzione, fatta a caldo, di un grammo di fluoroglucina in 10 c.c. di acido nitrico, e aggiungendo acqua fino a formare 100 c.c di soluzione, coll'aggiunta di un poco di acido nitrico se si vuole più forte. Per una lenta decalcificazione si

può usare una soluzione di una a 5 parti di acido nitrico in cento parti di acqua o di alcool, ovvero una soluzione al uno per cento di acido cromico.

Embedding di Tessuti induriti e preparazione di sezioni.

Per fare il taglio del tessuto col microtomo, è generalmente necessario anzitutto sostenere il tessuto indurito in modo da poter fare un taglio netto, e perciò bisogna imbibirlo di quale sostanza che dapprima fluida si fa poi solida e resistente. La sostanza da può semplicemente includere il tessuto, o imbibirlo completamento. Questo ultimo è il metodo più generalmente usato. La sostanza per questa

per questa imbibizione più usata è la paraffina del grado di liquefazione a 50° C.

~~Imbeiscione~~ nella Paraffina. Prima della immersione nella paraffina liquefatta, il pezzetto di tessuto può essere colorato; allora si disidrata passandolo per una serie di alcool (50 per 0/0, 75 per 0/0, 95 per 0/0) e si finisce mettendolo nell'alcool assoluto, e poi inzuppandolo di olio di legno di cedro, xylol, o cloroformio. Poi si nella paraffina liquefatta, appena calda, e vi si lascia per una o più ore, secondo la grossezza del pezzetto di tessuto. Allora si pone in una cassettina di latta o di porcellana o di vetro altra forma qualunque, la quale è stata previamente unta con glicerina, si copre interamente con paraffina

liquefatta e si lascia a raffreddare presto per evitare la cristallizzazione della paraffina. Un cubo di questa paraffina col tessuto incluso si fissa allora nella posizione voluta sul microtomo, sezioni sottili si tagliano e si fissano ad un vetro porta-oggetti, la paraffina si discioglie via colla trementina o col xylolo, e le sezioni si montano.

Se si vuole avere un nastro di sezioni successive e la paraffina è troppo dura per questo scopo, si può usare una paraffina più molle di cui il punto di liquefazione è di circa 40° C. colla quale si unge un lato del blocco o cubo, e allora le sezioni aderiranno insieme.

Preparazione di sezioni congelate.

Le soluzioni al bicromato e alla formalina sono

sono i migliori fluidi per la preservazione di tessuti intesi per essere congelati. Prima di mettere il tessuto sul microtomo a congelamento bisogna inzupparlo di acqua gommata (soluzione acquosa di gomma) e si può usare per questo scopo la gomma arabica o la destrina in soluzione sciropposa tenue.

<u>Inclusione in celloidina</u>. Il pezzo da essere imbevuto si disidrata coll'alcool, e poi si mette ~~per una notte o~~ per una giornata in una soluzione di celloidina in alcool ed etere, simile al collodione ordinario, e poi in collodione due volte più intenso. Dopo altre 24 ore si rimuove dal collodione e si pone sopra un portatore metallico che si fissa al microtomo, quando il collodione si è abbastanza indurito, coll'evaporazione

dell'etere. Avvenuto l'indurimento del collodione e l'unione del tessuto al portatore metallico, si immerge il tessuto in alcool al 85 per 0/0, e dopo poche ore si può tagliare via delle sezioni con un rasoio bagnato con alcool dello stesso grado. Si pongono le sezioni ottenute in alcool al 95 per 0/0, e poi si passano per l'olio di legno di cedro, o per l'olio di bergamotto, e si montano col balsamo al xylolo. Per questa operazione non si può far uso dell'olio di garofano e neppure dell'alcool assoluto. Il collodione essendo perfettamente trasparente, non è necessario di sciogliello via prima di montare la sezione al balsamo al xylolo, anzi serve per riunire e tenere insieme durante la montatura le diverse

diverse parti della sezione, ed è utile per operare su tessuti molto fragili o per avere sezioni grandi. Si può colorire il tessuto in massa prima dell'imbevimento col collodione, ovvero si può colorire le sezioni separatamente.

Metodi adesivi per montare le sezioni.

Le sezioni alla paraffina, o nastri di tali sezioni, si fissano al vetro porta-oggetti, - prima di subire il trattamento per la colorazione, o prima di essere trattati con altri liquidi - nella seguente maniera. Il vetro porta oggetti, o secondo il caso il vetro ~~porta~~ copra oggetti, si pulisce bene e poi si unge la sua superficie molto leggermente con bianco d'uovo, sia col dito o con pezzo di tela pulita, e lasciato a disseccare colla superficie unta rivolta in giù, o altrimenti protetta dalla polvere.

Generalmente è meglio preparare in avanti un buon numero di vetri in questa maniera, e tenerli alla mano per l'uso, in recipienti ben difesi dalla polvere.

Per fissare la sezione, si versa un poco di acqua sulla superficie del vetro che è stata unta di albumina fresca come è detto sopra, vi si pone la sezione o il nastro di sezioni, e si riscalda leggermente sopra una fiamma perchè la paraffina si metta ben piana sul vetro e vi si attacca, ma senza sciogliersi. Allora si sgocciola via l'acqua, si mette il vetro in un luogo caldo difeso dalla polvere per evaporare tutta l'acqua, il che richiede da mezza ora ad una ora) e poi si ~~secondo la~~ riscalda il vetro in modo da liquefare la paraffina. Appena raffreddata si immerge nel xylolo per rimuovere la paraffina

paraffina, dopo di che, se le sezioni sono già state colorate, si possono montare direttamente in balsamo al xylolo. Se non sono state già colorate, dopo il trattamento col xylolo, bisogna trattarle prima col alcool assoluto e poi con alcool di grado decrescente e finalmente con acqua. Poi si colorano, si lavano con acqua, poi si passano per diversi alcool a grado sempre crescente, fino all'alcool assoluto, e finalmente si trattano col xylolo, e si montano in balsamo al xylolo. Per molte sezioni si possono omettere i vari gradi d'alcool, ma è sempre bene usare l'alcool al 50 p% tra la lavatura coll'acqua e la lavatura finale collo alcool assoluto.

Un metodo più semplice, che in moltissimi casi risponde bene allo scopo,

consiste nel mettere la sezione o il nastro di sezioni alla paraffina, sulla superficie dell'acqua, in un bacino, appena riscaldata in modo da appiattire le sezioni senza liquefare la paraffina, poi si solleva la sezione sopra un vetro porta-oggetti ben pulito, passando il vetro sotto l'acqua e levando su lentamente la sezione. Si sgocciola via l'acqua, e si mettono i vetri ~~a~~ parte per qualche tempo a disseccare. Si trova che le sezioni hanno aderito molto bene al vetro. Si rimuove la paraffina lavandola col xylolo o immergendo il vetro nel xylolo. Se ~~la~~ sezione ~~non~~ è stata colorata, si passa per l'alcool e poi per l'acqua, si colora, si ripassa o ~~si~~ lava nell'acqua, poi nell'alcool e finalmente nel xylolo, come è detto

e' detto prima, e si monta col balsamo al xylolo: ma e' stata colorata si può montare direttamente col balsamo.

Conviene sempre tenere le varie soluzioni richieste in tubi cilindrici o recipienti a doccia in linea sul tavolo e trasferire il vetro porta-oggetti per turno da una soluzione all'altra. Questa serie di fluidi può essere formata così 1) Xylolo, 2) alcool assoluto, 3) 75 p % alcool, 4) 50 p.c. alcool, 5) acqua distillata; 6) soluzione colorante di ematossilina, 7) acqua di fontana 8) acqua distillata, 9) 50 per % alcool, 10) 75 p % alcool, 11) alcool assoluto % alcool metilico, 12). xylolo.

La seguente tavola schematica indica il metodo da seguire per sezioni o nastri di sezioni alla paraffina:

1. Ponete la sezione sopra un vetro porta oggetti o sopra un copra-oggetti in una goccia di acqua di fontana: Il vetro potrebbe essere prima unto con bianco d'uovo: riscaldate gentilmente
2). Gocciolate via l'acqua, e lasciate che il vetro si asciughi perfettamente.
3. Riscaldate sopra una fiamma o sopra un riscaldatore di rame, finchè la paraffina si sia appena liquefatta.
4 Sciogliete via la paraffina col xylolo. Se il tessuto è già colorato, montate in balsamo al xylolo.
Se non è stato colorato:
5. Mette in alcool assoluto, poi
6. In alcool a soluzioni di grado decrescente,
7. Colorate, es. gr. con ematossilina.
8. Mettete in acqua, o lavate con acqua

9)

9) Mettete in alcool a grado ascendente fino all'alcool assoluto.

10. Mettete nel xylol, o nell'olio di bergamotto o nell'olio di garofano.

11. Montate in balsamo al xylol.

Per sezioni fatte col metodo del congelamento o col metodo al collodion, se il tessuto è stato già colorato, si passano le sezioni per l'alcool, e poi pel xylolo o olio di bergamotto, e si montano in balsamo al xylol. Se non è stato già colorato, si procede come sopra, incominciando dal n° 7.

Colorazione delle Sezioni.

I fluidi più comunemente usati per colorare i tessuti o le sezioni, sono:

1. Soluzioni di ematossilina e di allume.
2. Soluzioni di carminio, con o senza allume.
3. Colori di anilina, es: fuchsina, eosina, blu di metilene ecc.

La durata dell'immersione nel liquido colorante varia secondo la forza del liquido e il metodo seguito per l'indurimento del tessuto. Si può evitare la necessità di colorire le sezioni separatamente, colorando il pezzetto di tessuto, tutto intero, prima dell'inclusione. Per questo oggetto l'intero pezzetto di tessuto si lascia per 24 ore o più, in una soluzione moderatamente diluita di ematossilina o di carminio-allume o di

carminio al borace. Se il tessuto si colori troppo, l'eccesso del colore si rimuove dalla sezione sul porta-oggetti, trattandola prima col xylol per rimuovere la paraffina, poi trattandola con alcool al 50 p. °/o, colla aggiunta di 1 a 10 parti di acido idroclorico per mille parti di alcool. Poi le sezioni si lavano bene in acqua di fontana, disidrate per mezzo dell'alcool in grado ascendente, passate per l'olio di garofano o pel xylolo, e finalmente montati col balsamo al xilolo. In certi casi, come per lo studio della cartilagine in via di ossificazione, si può usare la magenta in soluzione alcoolica per colorire il tessuto in massa, e allora

si passa il tessuto direttamente in olio di garofano, ed avvenuta la completa imbibizione con questo olio, si passa per lo xylolo alla paraffina liquefatta.

Si può anche colorare le sezioni, quando sono tuttora infiltrate di paraffina, mettendole sulla superficie della soluzione colorante riscaldata quanto basta per appianare la sezione senza liquefare la paraffina. Generalmente le sezioni così trattate richiedono una più lunga esposizione al liquido colorante, ma avvenuta la colorazione si trasferiscono nell'acqua, si immettono sopra un porta oggetti, si disseccano, poi si scoghè la paraffina col xilolo e si monta la sezione col balsamo al xilolo, cioè si trattano come sezioni di un tessuto già colorato in massa

prima dell'inclusione in paraffina.

Le principali soluzioni colorante e i metodi di usarne in circostanze speciali, sono le seguenti:

1. Ematossilina del Delafield. Si prepara aggiungendo 4 c.c di una soluzione satura di ematossilina in alcool, a 150 c.c. di una soluzione satura di allume in acqua. La miscela si lascia in riposo per 8 giorni, poi si decanta, e le si aggiungono 25 c.c. di glicerina e 25 c.m. di alcool metilico. Si lascia la soluzione a riposare per alcuni giorni prima di usarla. Per colorare le sezioni si mettono poche gocce di questa soluzione in un vetro d'orologio pieno di acqua distillata. Una colorazione eccessiva

si riduce lavando la sezione con alcool che contiene 1 per cento di acido nitrico o idroclorico. La soluzione che è blu diventa rossa col tempo, ma si ripristina il colore blu coll'aggiunta di poche goccie di ammoniaca.

2. <u>Ematossilina dell'Ehrlich.</u>

Si prepara disciogliendo 2 grammi di ematossilina in 100 c.c. di alcool, e poi si aggiungono 100 c.c di acqua, 100 c.c di glicerina e 10 c.c. di acido acetico glaciale. Finalmente si satura la soluzione con allume. Questa soluzione si conserva benissimo per lungo tempo, ed è la preferita per la colorazione in massa perchè non colora eccessivamente. Per usarla si diluisce con acqua

distillata

ovvero con 30 per 70 di alcool. Dopo la colorazione si lavano i tessuti o le sezioni abbondantemente in acqua per sviluppare il colorito blu dell'ematossilina.

3. Ematossilina di Kultschitzky.

Si discioglie un grammo di ematossilina in un poco di alcool, e si aggiungono 100 c.c di una soluzione di acido acetico al 2 per cento. Si usa per colorire sezioni di tessuti del sistema nervoso. (processo di Weigert-Pal).

4) Emalume. Le soluzioni di ematossilina coll'allume acquistano le loro proprietà colorante quando l'ematossilina si converte col tempo in emateina. Quindi il Mayer raccomanda questa ultima sostanza invece dell'ematossilina per uso immediato.

La soluzione si prepara nella seguente maniera: Si disciolgano 50 grammi di ammonia-allume in 1 litro di acqua, ed un grammo di emateïna in 100 c.c. di alcool rettificato. Si aggiunga la soluzione di emateina gradatamente alla soluzione di ammonia-allume. La mistura si può usare in sostanza, ovvero diluita con acqua distillata. Un pezzetto di thymol ovvero un poco di acido carbolico aggiunto alla miscela impedirà la formazione di muffe.

5.). <u>Eosina</u>. Si può usare una soluzione al 1 per cento in acqua, ovvero una soluzione satura in alcool al 75 p. %. Questa soluzione raramente si usa sola, ma si può usare per colorire il fondo quando si usa associata all'ematossilina. Dapprima le sezioni si colorano bene colla

colla ematossilina e si lavano con acqua; poi si colorano colla soluzione di eosina, e poi attraverso l'alcool al 75 per 0/0, e alcool al 90.° per 0/0, per sciogliere una parte dell'eosina, e poi si passa all'olio di garofano, xylolo e balsamo al xilolo. L'eosina colora i corpuscoli del sangue in un bel rosso aranciato.

6). <u>Metodo di R. Heidenhain</u>. Dopo di aver indurito il tessuto in alcool, ovvero in una soluzione satura di acido picrico e poi in alcool, si pone per 12 a 14 ore in una soluzione acquosa di ematossilina ad $\frac{1}{3}$ per cento, e poi per 12 a 24 ore in una soluzione al $\frac{1}{2}$ per cento di cromato giallo di potassa. Finalmente si pone in alcool, si passa per il xilolo, e si include in

paraffina.

7). Metodo di M. Heidenhain. Si indurisca il tessuto in sublimato corrosivo, e poi si metta in alcool. Si fissino le sezioni sul porta-oggetti col metodo dell'acqua; si trattino con alcool jodizzato, si trasferiscano ad una soluzione al $2\frac{1}{2}$ per cento di solfato (o tartrato) di ferro e di ammonio, e vi si lascino per 4 a 8 ore, Si lavino con acqua distillata, si pongano in una soluzione acquosa pura di ematossilina al $\frac{1}{2}$ per cento, per 12 a 18 ore. Si lavino con acqua per circa 15 minuti, si disidratino col metodo usuale e si montino al balsamo nel xilolo. Questo metodo è adoperato per indicare il centrosoma nelle cellule, e per per mostrare il tessuto retiforme.

8) Carmallume del Mayer. Si usa tanto per le sezioni come per la colora-zione in massa, e se le sezioni si passano dopo nell'alcool che contiene acido picrico in soluzione, si ottiene una colorazione doppia. Si prendano:

Acido carminico	1 grammo
Allume-ammonia	10 grammi
Acqua distillata	200 c.c.

Si fanno bollire insieme, e raffredata la miscela, si filtri. Aggiungere finolo o acido carbonico per impedire le muffe.

9) Carminato d'Ammonio. Si prepara disciogliendo il carminio nell'ammo-niaca, e lasciando l'eccesso di ammoniaca a sfuggire colla lenta evaporazione. Il sale o residuo ottenuto si lasci seccare, e se ne fa uso

sciogliendolo in acqua, quanto è necessario.

10) <u>Acido Picrico</u>. Si può usare una soluzione satura di acido picrico in alcool, per una doppia colorazione dopo l'ematossilina o il carminio. L'eccesso di acido picrico si toglie via lavando la sezione col alcool (forte). Questa doppia forma di colorazione si usa per mostrare i tessuti cheratinizzati e le fibre muscolari.

11). <u>Picrocarminato di ammonio</u> o <u>picro-carminio di Ranvier</u>. Ad una soluzione satura di acido picrico (in acqua?), aggiungere una soluzione forte di carminio in ammoniaca, finchè incominci a formarsi un precipitato. Evaporare a bagno-maria, o lasciare ad evaporare spontaneamente, a metà del volume originario, aggiungere alcune goccie di acido carbolico per

prevenire le muffe, e filtrare via il sedimento.

12). <u>Picro-carminio di Bourne</u>. In una bottiglia capace di contenere 250 c.c. mettere 5 c.c. di ammoniaca e 2 grammi di carminio. Si chiude col tappo a smeriglio, si agita bene, e si lascia a riposare per 24 ore. Poi aggiungere gradatamente, e scotendo o agitando continuatamente, 200 c.c. di una soluzione satura di acido picrico in acqua distillata. Si lascia a riposare per 24 ore. Aggiungere lentamente, agitando sempre, 11 c.c. di una soluzione acquosa di acido acetico al 5 per 0/0. Si lascia per un giorno, si filtra, e al filtrato si aggiungono poche goccie di ammoniaca, e si conserva in bottiglia a tappo a smeriglio.

13). <u>Borace-Carminio</u>. Disciogliere 4 grammi borace e 3 grammi carminio in 100 c.c. di acqua calda. Dopo 3 giorni aggiungere 100 c.c. di alcool al 70 p. %, lasciare a riposare per due giorni, e poi filtrare. La soluzione migliora invecchiando ed è utile per colorire i tessuti in massa. Dopo la colorazione col borace-carminio i tessuti si pongano in una soluzione di alcool a 70 p. %, che contiene 5 goccie di acido cloridrico per ogni 100 c.c. di alcool.

14) <u>Colori di Anilina</u>. Questi si usano in soluzioni acquose, alle quali si può aggiungere $\frac{1}{100}$ per 100 di potassa caustica, o in acqua la quale è stata agitata con olio di anilina, e generalmente con queste ~~soluzioni~~ si colora molto fortemente e poi si toglie via l'eccesso di colore con alcool assoluto che abbia $\frac{1}{5}$ del suo volume di olio di anilina,

anilina, dal quale la sezione si può passare direttamente al xylol e al balsamo; ovvero si toglie l'eccesso di colore con alcool-acido (che contiene da 1 a 10 per 1000 di acido idroclorico) al quale si fa seguire l'alcool assoluto e quindi il xylol e il balsamo.

Si usano più comunemente i colori "basici", cioè: blù di metile, blù di metilene, violetto di genziana, blù di toluidin, saffranina, e vesuvina; come pure i colori "acidi" quali sono: eritrosina, magenta acida, o fucsina acida, e G. Arancio. Una colorazione doppia si ottiene combinando l'eosina col blù di metile o col blù di toluidin, colorando prima le sezioni per 10 minuti di soluzione acquosa di eosina al 1 per 100, e

poi previa lavatura con acqua, colorando per 20 minuti con una soluzione di blù al 1 per cento. Poscia si toglie l'eccesso di colore coll'alcool assoluto o coll'alcool assoluto con olio di anilina. La decolorazione si arresta col xilolo.

Una colorazione tripla si può ottenere col fluido di Ehrlich-Biondi, formato mescolando insieme, soluzioni acquose di Arancio G., fuchsina acida, e verde-metile in certe proporzioni.

15/. Magenta. Si adopera in soluzione all'uno per cento in alcool al 50 per cento, alla quale si può aggiungere ~~qualche~~ una goccia di una soluzione alcoolica al 1 per cento di violetto di genziana, per ogni centi-

-metro

-metro cubico di soluzione. Questa mistura è ottima per colorare il tessuto connettivale. Pel tessuto osseo e pel tessuto ghiandolare si può usare una soluzione di magenta all'uno per cento in 95 per cento di alcool, lasciandovi il pezzetto di tessuto per parecchi giorni, e poi trasferendolo allo olio di garofano per poche ore, e finalmente trasferendolo al xilolo, e includendolo in paraffina nel modo ordinario. Si intende, il tessuto osseo si deve ~~prima~~ decalcificare prima di sottoporlo alla colorazione.

16) <u>Orceina</u>. Si prepara disciogliendo un grammo di orceina in 100 c.c. di alcool assoluto contenente 1 c.c di acido idroclorico. Si pongono le sezioni con un

poco di questa soluzione in un vetro d'orologio, e si riscalda leggermente, lasciando che il liquido si evapori fino quasi a secchezza. Si disidrata in alcool, il quale rimuove anche l'eccesso di colore: e si passa pel xilolo al balsamo. Questa è una buona colorazione pel tessuto elastico.

17) Il metodo di Flemming per i nuclei in cariocinesi. Ottimo metodo per colorare i nuclei in processo di mitosi. Gli elementi del tessuto essendo stati fissati per mezzo dell'acido picrico, del sublimato, dell'acido acetico e dell'acido cromico, -to, della soluzione di Flemming, o della soluzione di Carnoy; si prendono sezioni sottili o pezzettini e si pongono per due giorni in una soluzione alcoolica

satura

satura di saffranina, mista con una quantità uguale di acqua di anilina. Allora si lavano con acqua distillata, e si decolorano in alcool all'olio di anilina, o in alcool con 1 per 1000 di acido cloridrico, finchè il colore sia completamente lavato da tutto fuorchè dal nucleo. Poi si lavano nuovamente in acqua e poste per due ore in una soluzione acquosa satura di violetto di genziana, si lavano di nuovo in acqua distillata, si scolorano con alcool all'anilina, finchè soltanto i nuclei restano colorati, poi si trasferiscono in olio di bergamotto o in xilolo, e si montano in balsamo. Il violetto

di genziana ed alcuni altri colori di anilina si possono usare in vece della saffranina. L'ematossilina del Delafield (seguita da acido), o l'ematossilina di Ehrlich sono anche esse buone per colorare i nuclei in mitosi.

18). <u>Soluzione del Marchi</u>. Consiste in una miscela di 2 parti del fluido di Müller con una parte di una soluzione di acido osmico al 1 per cento. Serve per colorare le fibre nervose in via di degenerazione, prima del principio del periodo di sclerosi. Tutte le fibre midollate degenerate si colorano in nero, ma il rimanente della sezione rimane scolorato. Si mettano pezzi sottili del cervello o del cordone vertebrale

da

da essere studiato, separatamente in una quantità della soluzione del Marchi, previo indurimento per 10 giorni nel fluido del Müller, lasciandoli ivi per una settimana o più. Poi si fissano su un porta oggetto e si montano al balsamo come al solito.

19/ <u>Metodo di Weigert-Pal.</u> Si usa per il sistema nervoso centrale. Con esso tutte le fibre nervose midollate si colorano in nero, mentre la sostanza grigia, e i tratti sclerosati di sostanza bianca non si colorano. I pezzetti che sono stati induriti nel fluido del Müller, e poi lasciati per breve tempo in alcool, senza lavarli in acqua, si includono in celloidina (collodion) e se ne fanno le sezioni per quanto

si può sottili; ovvero si fanno le sezioni direttamente dal fluido del Müller, col metodo del congelamento previo un inzuppamento per poche ore in acqua gommata. Nell'uno o nell'altro caso, le sezioni ottenute si pongono nell'acqua, e da questa sono trasferite al fluido del Marchi dove sono lasciati per poche ore. Allora si lavano colla acqua e si trasferiscono alla emafossilina del Kulschitzky, dove si lasciano per un giorno, assumendo un colorito nero. Poi si lavano in acqua, e si scolorano col processo di Weigert-Pal. Per far subir loro questo processo, si pongono prima per cinque minuti in una soluzione

soluzione ad $\frac{1}{4}$ per cento di permanganato di potassio; si lavano in acqua e si trasferiscono alla soluzione del Pal, composta di 1 grammo di solfito di soda, 1 grammo acido ossalico in 200 c.c. di acqua distillata, e in questa soluzione avviene lo scoloramento. Generalmente basta lasciarveli per pochi minuti ma si possono lasciare per un tempo più lungo, se necessario, senza alcun nocumento. Se dopo mezza ora il tessuto non si è abbastanza scolorato, si metta nuovamente, previa lavatura in acqua, per pochi minuti nella soluzione di permanganato di potassa come prima, e poi di

nuovo nella soluzione del Pal.
Poi, avvenuto lo scoloramento, si passano per l'acqua, alcool, con o senza eosina, olio di Bergamotto o xylol, e finalmente si montano le sezioni in balsamo. Con questo metodo le fibrille finissime si mostrano con molta precisione, colorate perfettamente in nero, mentre il tessuto circostante resta scolorato, e la colorazione ottenuta è molto persistente.

Come modificazione di questo processo, Bolton raccomanda di indurire nella formalina, e poi porre le sezioni per alcuni minuti in una soluzione di acido osmico al 1 per cento; si colorano per due ore in ematossilina acida

al

al 40°C., e poi si procede allo scoloramento col metodo di Weigert-Pal, come prima.

20) Colorazione col cloruro d'oro.

a. Metodo di Cohnheim. Il tessuto fresco si pone per 30 a 60 minuti in una soluzione di cloruro d'oro al $\frac{1}{2}$ per cento. Poi si lava, e si pone in molta acqua leggermente acidulata con acido acetico, e si lascia per 2, o 3 giorni alla luce in un luogo caldo. Questo sistema è ottimo per la cornea. Se si vuole colorire le fibrille nervose dell'epitelio, la cornea si pone dopo 24 ore in una miscela fatta di una parte di glicerina e due parti di acqua, e vi si lascia per

24 ore o più.

b. Metodo del Löwit. Piccoli pezzi del tessuto fresco si pongono in una mistura fatta da una parte di acido formico, in due a quattro parti di acqua, e vi si lasciano per mezzo minuto a un minuto: poi si mettono per 10 a 15 minuti in una soluzione di cloruro d'oro al 1 per %; poi di nuovo nella mistura di acido formico per 24 ore, e dopo in acido formico puro per altre 24 ore. Quando è stato rimosso dalla soluzione di cloruro d'oro, e mentre sta nell'acido formico, il tessuto deve stare sempre all'oscuro

c Metodo del Ranvier. Si immerge il tessuto nel succo di limone per

per 5 a 10 minuti, poi si lava con acqua e si pone in una soluzione di cloruro d'oro all'1 per 0/0 per 20 minuti. Poi si procede come nel metodo del Cohnheim o in quello del Löwit.

21/. Colorazione col nitrato d'argento.

Il tessuto fresco si lava con acqua distillata; si immerge per 1 a 5 minuti in una soluzione di nitrato d'argento al ½, o al 1 per cento; si lava in acqua distillata e si espone alla luce solare, in acqua, o in alcool al 70 per 0/0, o in glicerina. Il tessuto che è generalmente una membrana sottile si monta in glicerina; ovvero si appiana sull'acqua sopra un porta-oggetti, si sgocciola via l'acqua, si secca, e poi si monta col balsamo al xilolo. Questo metodo

si usa per mostrare l'endotelio, e in generale per colorare (in nero) la sostanza intercellulare.

22/. Metodi del Golgi al cromato d'argento.

Sono utili per studiare la relazione delle cellule e delle fibre del tessuto nervoso centrale. I metodi più in uso sono due:

a. Piccolissimi pezzi di tessuto che sono stati induriti per alcune settimane in una soluzione di bicromato di potassio al 3 per %, o nel fluido del Müller, si pongono per mezza ora all'oscuro in una soluzione di nitrato d'argento al 0.75 per cento. Poi si mettono per 24 ore o più, in una altra quantità della stessa soluzione di nitrato d'argento (sempre all'oscuro)

alla

alla quale è stata aggiunta una traccia di acido formico. Poi si mettono per mezza ora in alcool al 96 per cento, e poi si tagliano le sezioni in celloidina con un microtomo, ovvero fatta l'inclusione - senza imbibizione, - in paraffina si possono tagliare le sezioni con un rasoio. Non occorre che le sezioni siano troppo sottili. Le sezioni si montano al balsamo in xilolo, che si lascia a disseccare all'aria, senza coprirle con un vetro copri-oggetti, ma il balsamo deve restare esposto all'aria.

b. Il tessuto, in pezzetti piccolissimi, si mette immediatamente ancora fresco, in una mistura

fatta con 3 parti di fluido del Muller al bicromato, ed una parte di acido osmico. Vi si lascia il tessuto per 1 a 8 giorni, ogni giorno trasferendo un pezzettino in una soluzione al nitrato d'argento al 0.75 per cento in oscurità. Il susseguente trattamento è lo stesso come prima. Per alcuni ~~gi~~ organi sarà vantaggioso ripetere il processo, riponendo il tessuto per uno o due giorni in mistura di bicromato e di acido osmico come sopra, dopo il trattamento al nitrato d'argento, e poi rimettendolo nella soluzione di nitrato d'argento come prima. (Metodo doppio di Ramón). Questo metodo è assai più rapido

del

del primo è da' migliori risultati.

23). Metodo di Ehrlich al blu di metilene.

È utilissimo per mostrare le terminazioni dei nervi, e anche in alcuni casi per mostrare le relazioni delle cellule nervose e delle fibre nel tessuto nervoso centrale. Il tessuto deve essere ancora allo stato vivente. Perciò si inietta una soluzione acquosa di blu di metilene (1 parte in 100 parti di soluzione salina normale calda), in una vena di un animale anestesizzato, finchè tutto il sangue diventa di un colorito blu; ovvero si inietta soltanto nei vasi della parte che si vuol studiare, in un animale appena ucciso. Ma si possono ottenere

buoni risultati anche immergendo dei pezzetti freschissimi di un tessuto vivo, in una soluzione meno concentrata ($\frac{1}{10}$ per cento); o nel caso del sistema nervoso centrale spargendo il blu di metilene in polvere sopra una superficie tagliata di fresco, lasciandola per qualche tempo per permettere la penetrazione del colore, e poi trattandola col picrato d'ammonio e colla soluzione di Bethe. Nell'uno o nell'altro caso il tessuto deve essere liberamente esposto all'aria; allora il colorito blu comparisce nelle cellule nervose e nei cilindri assili, fino alle loro ramificazioni più fine. Ma questo colorimento non persiste, ma sparisce

dopo

del primo è da migliori risultati.

23). Metodo di Ehrlich al blu di metilene.

È utilissimo per mostrare le terminazioni dei nervi, e anche in alcuni casi per mostrare le relazioni delle cellule nervose e delle fibre nel tessuto nervoso centrale. Il tessuto deve essere ancora allo stato vivente. Perciò si inietta una soluzione acquosa di blu di metilene (1 parte in 100 parti di soluzione salina normale calda), in una vena di un animale anestesizzato, finchè tutto il sangue diventa di un colorito blu; ovvero si inietta soltanto nei vasi della parte che si vuol studiare, in un animale appena ucciso. Ma si possono ottenere

buoni risultati anche immergendo dei pezzetti freschissimi di un tessuto vivo, in una soluzione meno concentrata ($\frac{1}{10}$ per cento); o nel caso del sistema nervoso centrale spargendo il blu di metilene in polvere sopra una superficie tagliata di fresco, lasciandola per qualche tempo per permettere la penetrazione del colore, e poi trattandola col picrato d'ammonio e colla soluzione di Bethe. Nell'uno o nell'altro caso il tessuto deve essere liberamente esposto all'aria; allora il colorito blu comparisce nelle cellule nervose e nei cilindri assili, fino alle loro ramificazioni più fine. Ma questo colorimento non persiste, ma sparisce

dopo

dopo qualche tempo, ed invece si colorano i tessuti vicini. Per fissare il colorimento, si toglie il tessuto al momento in cui la colorazione è più distinta nelle fibre nervose, e si mette per una ora o due in una soluzione satura di picrato di ammonio, dopo di che si può montare il preparato in glicerina con un poco di picrato d'ammonio.

Per farne delle sezioni da montare in balsamo, il tessuto dopo assoggettato al trattamento col picrato d'ammonio, si mette per alcune ore nel fluido di Bethe costituito così:

Molibdato d'ammonio	1 gramma
Soluz: d'acido cromico al 2 per cento.	10 c.c.
Acqua distillata	10 c.c
Acido idroclorico	1 goccia.

L'effetto di questa mistura è di rendere il colore (blu di metilene) insolubile nell'alcool. Poi si procede come al solito.

24. Metodo di Sihler per colorire le terminazioni nervose nei muscoli e nei vasi sanguigni. Si macera il tessuto per 18 ore nella seguente soluzione: Acido acetico ordinario 1 parte, glicerina 1 parte, e sei parti di soluzione di idrato di cloralio al 1 per %. Da questa soluzione il tessuto si trasferisce in glicerina per una o due ore, e poscia per 3 a 8 giorni nella seguente soluzione: Ematossilina di Ehrlich 1 parte, glicerina 1 parte, e soluzione di idrato di cloralio al 1 p. % 6 parti. Finalmente si conserva il tessuto in glicerina, cambiando

la

la glicerina ogni tanto. Le preparazioni si fanno dissociando il tessuto con aghi. Se le fibre sono state troppo colorate si possono differenziare coll'acido acetico finchè il colore blu sarà ~~d~~ cambiato in violetto.

25/. Metodo di Nissl per colorare i granuli cromatici nelle cellule nervose.

Consiste nel colorire fortemente col blu di metilene, e poi differenziare con alcool. (V. n. 14).

Nissl raccomandava un alcool a 90°. come reagente per l'indurimento, ma si preferisce la formalina e il sublimato corrosivo, seguito dallo alcool. Invece del blu di metilene si può usare la toluidin-blu del Mann. Le sezioni si possono colorire prima con eosina in

soluzione acquosa al 1 per cento, e poi dopo lavatura in acqua, si colorisce con blù di metilene in soluzione al 1 per cento. Si differenziano i colori meglio in alcool all'anilina. Il colorimento si affretta e si accentua riscaldando le soluzione a circa 70° C., e allora si può colorire bene in pochi minuti.

1921-22

Lezioni di Botanica

Ottobre, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24, 26, 28, 31 = 13 lezioni

Dic. 12, 19, 24. 3 lezioni, Pratica Argotti

totale 16 lezioni

Novembre 4, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28 e 30, 11 lezioni, di cui 3, (cioè 11, 18, e 25) pratica microscopica

Dic. 9, 16, 23, 30. 4. Pratica Argotti

totale 15 lezioni

Dicembre 5 lezioni + 1. pratica Argotti.

totale 6 lezioni

Gennaio (1922) 9 lezioni + 2 pratica A = 11 lezioni

2 due lezioni di C. A. ebbero luogo l'11 e il 18.

Febbraio (1922) 11 lezioni, cioè:

9 lezioni + 2 pratica istologica, + 2 pratica Argotti.

Marzo (1922) 11 lezioni, cioè

9 lezioni, 2 p. ist., + 1. p. Argotti + 1 recup.

Aprile (1922.) 5 lezioni, cioè 3 lezioni + 1 prat. micros. + 1. prat. Argotti.