

MIKROSKOPICKÁ TECHNIKA

NAPSAL

JOSEF REJSEK,

praeparátor ústavů a klinik české lékařské fakulty v Praze

SE 63 OBRÁZKY V TEXTU

DRUHÉ, UPRAVENÉ A ROZŠÍŘENÉ VYDÁNÍ



V PRAZE

NÁKLADEM ČESKÉ GRAFICKÉ UNIE A. S.

1927.

II 2499L

MIKROSKOPICKÁ TECHNIKA

Napsal

JOSEF REJSEK,

praeparátor ústavů a klinik české lékařské fakulty v Praze

Se 63 obrázky v textu

DRUHÉ, UPRAVENÉ A ROZŠÍŘENÉ VYDÁNÍ



V PRAZE
NÁKLADEM ČESKÉ GRAFICKÉ UNIE A. S.
1927.

Veškerá práva vyhrazena.

Tiskem UNIE v Praze.

ÚVOD.

Na přání, z různých stran pronesená, abych napsal příručku mikroskopické techniky, ve které uvedl bych vše, co po mnohaleté praxi pokládám za nejvýhodnější a nejdůležitější, odhodlal jsem se tak učiniti. V české literatuře nemáme většího odborného díla, pouze prof. Dr. Srdínko ve své učebnici histologie uvádí stať o mikroskopické technice histologické. Víím, že nepřináším vše, co od let osmdesátých minulého století v tomto oboru bylo uveřejněno. Hleděl jsem v první řadě k tomu, abych uvedl jen skutečně osvědčené metody, o jejichž dobrých a spolehlivých výsledcích z vlastní zkušenosti sám jsem se přesvědčil.

Celou látku rozdělil jsem na jednotlivé oddíly; všude tam, kde to za nutné pokládám, uvádím u jednotlivých method chyby, které nejčastěji při práci vznikají, jakož i způsob, jak možno se jich vyvarovati event. je odstraniti.

V oddíle „o fixování“ a „barvení“ preparátů uvádím názory různých badatelů, jelikož mám za nutné, aby pracovník s jich úsudky byl seznámen.

Odevzdávám knihu tuto veřejnosti, pracovníkům v histologickém badání, s tím přáním, aby se stala skutečnou příručkou.

V P r a z e, v lednu 1920.

PŘEDMLUVA K DRUHÉMU VYDÁNÍ MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY.

První vydání této knihy bylo během jednoho roku úplně rozebráno, což jest zajisté nejlepším důkazem, že knihy bylo jistě zapotřebí.

Na přání nakladatelství podávám veřejnosti druhé vydání, ve kterém se snažím přinést některé kapitoly úplně nové, jiné jsou doplněny a rozšířeny.

Odevzdávám druhé vydání mikroskopické techniky veřejnosti s tím přáním, aby našlo téhož přijetí jako vydání první.

V P r a z e, v květnu 1927.

OBSAH.

Strana

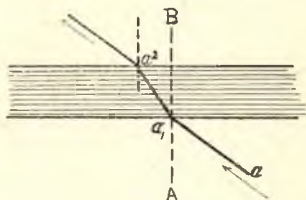
| | |
|---|-----------|
| I. O lomu světelných paprsků a o vzniku obrazu v čočkách | 7 |
| Postup paprsků světelných v čočkách | 7 |
| Vznik obrazu čočkou bikonvexní | 8 |
| Mikroskopické objektivy | 10 |
| Kombinace čoček | 11 |
| Numerická apertura | 12 |
| Jaký vliv má krycí skélko na prostup světelných paprsků? | 14 |
| Vliv prostředí mezi krycím skélkem a objektivem | 15 |
| Prohlížení preparátu immersí | 15 |
| Zvětšení v mikroskopu | 16 |
| Zorné pole objektivu. | 16 |
| II. Mikroskop a přístroje pomocné | 19 |
| Drobnohled | 20 |
| Stereoskopický mikroskop | 25 |
| Okuláry. | 27 |
| Projekční a mikrofotogr. okuláry | 28 |
| Objektivy | 29 |
| Pomocné přístroje při drobnohledu | 32 |
| Ultramikroskop | 34 |
| Přístroj k osvětlování v temném poli | 35 |
| Přístroje k mikroskopickému kreslení | 36 |
| Edingerův přístroj ke kreslení | 39 |
| Přesné měření mikroskop. elementů | 40 |
| Polárníční přístroj | 41 |
| Známkovací přístroj | 42 |
| III. Histologické nástroje | 43 |
| Nástroje pro histologické vyšetřování | 43 |
| Lopatičky neb lžičky histologické | 44 |
| Skleněné nádoby k mikroskopování | 44 |
| Tekutiny na mikroskopická pozorování | 45 |
| Prosvětlující látky | 46 |
| Látky k ukládání preparátů pro trvalé uschování | 46 |
| IV. Vyšetřování za čerstva a fixace. | 48 |
| Fixace preparátů | 53 |
| Prostředky fixační | 56 |
| Uchování makroskop. preparátů v přirozených barvách dle Kai-erlinga | 67 |
| Chitin | 67 |
| V. Odvápňení, macerování, bílení, zažívání. | 69 |
| Hotovení výbrusů | 69 |
| Metody odvápňovací | 69 |
| Macerační tekutiny | 73 |
| Zažívání | 76 |
| Odbarvování, bílení | 76 |
| Výbrusy | 77 |
| VI. Mikrotom | 80 |
| Mikrotomové nože | 88 |

| | Strana |
|--|--------|
| VII. Příprava a montování preparátů | 90 |
| Skélka podložní a krycí | 90 |
| Všeobecné o přípravě trvalých preparátů | 91 |
| Trvalé preparáty montované v glycerinu | 92 |
| Montování velkých řezů | 94 |
| VIII. Příprava k hotovení řezů jednotlivých a seriových | 95 |
| Metoda zalévání preparátů do celloidinu | 95 |
| Metoda zalévání preparátů do paraffinu | 98 |
| Zaliti preparátů do celloidin-paraffinu | 103 |
| IX. Hotovení řezů | 105 |
| Hotovení jednotlivých řezů z celloidinu | 105 |
| Seriové řezy preparátů zalitých v celloidinu | 107 |
| Lepení celloidinových řezů na bílek | 111 |
| Příprava k řezání z paraffinu | 112 |
| Lepení paraffinových řezů na skélko podložní | 116 |
| Vady, vyskytující se při hotovení seriových řezů z paraffinu | 121 |
| X. Barvení preparátů | 123 |
| Barviva haematoxylinová | 126 |
| Karminová barviva | 131 |
| Basické t. zv. neutrální karmíny | 133 |
| Alkoholové karmíny | 134 |
| Barviva dehtová | 135 |
| Speciální metody barvení | 146 |
| Barvení řezů centr. nervstva | 148 |
| Barvení osového válce v nervstvu | 154 |
| Impregnace osových válců stříbrem | 158 |
| Barvení gangl. buněk centrálního nervstva | 160 |
| Vyšetřovací metody na neurofibrilly | 162 |
| Neuroglia | 168 |
| Impregnace chloridem zlatnatým | 169 |
| Elastická tkáň | 173 |
| Barvení tuku | 177 |
| Krevní sušené preparáty a jich barvení | 177 |
| Barvení řezů orgánů lymfoidních | 180 |
| Granula v buňkách, oxydasy a peroxydasy | 181 |
| Některé důležitější reakce botanické | 184 |
| XI. Injekční metoda mikroskopická | 187 |
| Příprava barev pro mikroskopickou injekci | 187 |
| Vodný roztok berlínské modře bez gelatiny | 190 |
| Příprava berlínské modře rozpustné | 190 |
| Barva pro modrou injekci gelatinovou | 191 |
| Stříbrná gelatina dle Hoyera | 192 |
| Přístroje k injekcím | 193 |
| Příprava materiálu k injekci | 196 |
| Injekční metoda cevstva pro vyšetřování röntg. paprsky | 198 |
| XII. Rekonstrukční metody | 199 |
| XIII. Mikrofotografický přístroj | 205 |
| XIV. Barvení mikroorganismů | 211 |
| XV. Sbírání planktonu | 218 |
| XVI. Tabulka ředění alkoholu na určitý stupeň | 220 |

I. O lomu světelných paprsků a o vzniku obrazu v čočkách.

Dříve, než přistoupíme k popisu mikroskopu a ostatních přístrojů, nutno si uvědomiti základní pojmy o lomu světla a jeho uchýlení vůbec a zvláště tehdy, prochází-li různými čočkami.

Jak známo, prostoupí-li paprsek světelný z prostředí řidšího (vzduchu) do prostředí hustšího (skla) nebo opačně, uchýlí se, říkáme: světlo se láme. Na přiloženém obrazci (obr. 1.) vidíme tento postup lomu; paprsek AB , jenž probíhá v kolmici

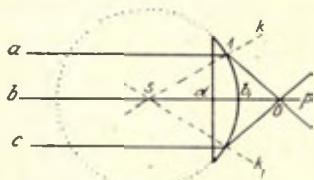


Obr. 1.

ke sklu, prostupuje tímto, aniž by se uchýlil. Jinak paprsek a , který dopadá šikmo na sklo v místě a^1 , uchýlí se, přecházejí ze vzduchu do skla, ke kolmici, kterou si vedeme v bodě vstupu. Při prostupu ze skla do vzduchu láme se opět, a to tak, že uchýlí se od kolmice v bodě výstupu při a^2 .

Postup paprsků světelných v čočkách.

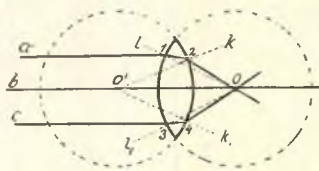
Na plankonvexní čočku dopadají paprsky a , b , c (obr. 2.). Paprsek b , který dopadá kolmo na čočku, prochází touto, aniž by se uchýlil v bodě d , a při výstupu z čočky jde dále bez uchýlení. Paprsek a , poněvadž dopadá kolmo na sklo (na plochu), postupuje dále čočkou



Obr. 2.

bez uchýlení, avšak v bodě I při výstupu láme se od kolmice k a v dalším postupu protíná střední paprsek v bodě O . Stejně tak chová se paprsek c , který při výstupu z čočky taktéž se láme od kolmice a protíná střední paprsek opět v bodě O . Veškeré

paprsky světelné dopadající na čočku mezi body a, c , lámou se a sbíhají se v bodě O . Poněvadž v paprscích světelných jsou i paprsky tepelné, které se soustřeďují v bodě O , nazývá se bod ten ohnisko — focus. Vzdálenost tohoto bodu od čočky nazývá se ohniskovou vzdáleností čočky, a paprsek postupující středem čočky,



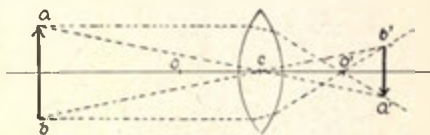
Obr. 3.

který nevykazuje žádné úchylky, nazýváme optickou osou čočky. Veškeré paprsky, které neprocházejí středem čočky, se lámou, a to tím více, čím jsou vzdálenější od centra, t. j. blíže k okraji čočky.

V čočce bikonvexní (spojce) dochází ke dvojímu lomu, a to jak při vstupu, tak i při výstupu paprsků z čočky. Paprsky a, b, c (obr. 3.) dopadají na čočku; paprsek a při vstupu do čočky se láme v bodě l ke kolmici (Ol), při výstupu se uchýlí od kolmice ($O'k$) do bodu O , totéž děje se s paprskem c . Paprsek b , jdoucí středem čočky, postupuje bez uchýlení.

Vznik obrazu čočkou bikonvexní.

Z dříve uvedeného vidíme, že všechny paprsky vycházející z jednoho a téhož bodu lámou se při prostupu čočkou, a opět v jednom a témže bodě se sbíhají. Na tomto základě možno si vysvětliti vznik obrazu čočkou. Předmět může se nalézati v různé vzdálenosti od čočky, buď mezi ní a ohniskem, nebo za ohniskem. Přihlédneme k případu,



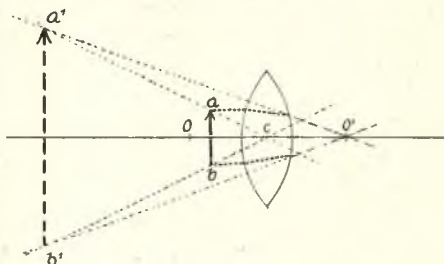
Obr. 4.

kde se předmět $a b$ (obr. 4.) nalézá za ohniskem. Z bodu a vstupuje paprsek do čočky, láme se nejdříve ke kolmici a při výstupu z čočky se zase uchýlí, a to od kolmice do ohniska O' a postupuje dále. Totéž se děje s paprskem b , kde paprsek se dvakrát lomí a prochází poté rovněž ohniskem. Z obou bodů a, b jdou rovněž paprsky, které projdou středem čočky, aniž by se uchýlily, a v dalším postupu kříží se s paprsky procházejícími ohniskem, a to v bodech a', b' . Tak povstal obraz $a b$, a to obraz obrá-

cený, skutečný, který možno na matnou skleněnou desku zachytiti (komora fotografického aparátu). Tento obraz u mikroskopu vzniká v objektivu.

V druhém případě nalézá se předmět mezi čočkou a jejím ohniskem. Z bodů a, b (obr. 5.) dopadají paprsky na čočku, lámou se do ohniska O' a pokračují dále zá-

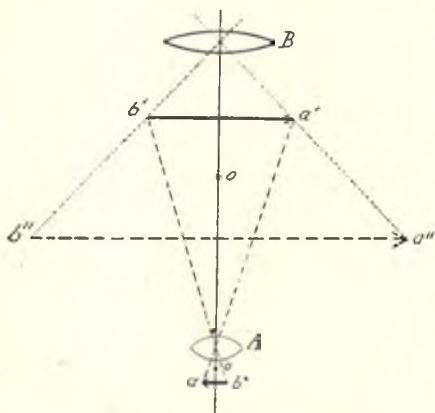
roveň s paprsky jdoucími středem čočky, které se nelámou. Prodloužíme-li si tyto paprsky ve směr kde se nalézá předmět, tu křižují se v bodech a', b' . Pohlížíme-li do lupy, tu se zdá, že paprsky vycházejí z obrazu předmětu a ne z předmětu samého, vidíme obraz



Obr. 5.

zdánlivý, virtuální obraz zvětšený, přímý. Tento případ odehrává se v okuláru mikroskopu. Na základě těchto dvou pouček: 1. z předmětu nalézajícího se za ohniskem dává čočka bikonvexní skutečný či reálný obraz, a za 2. z předmětu nalézajícího se mezi ohniskem a čočkou (spojkou) vytvoří se obraz virtuální, zvětšený, možno si sestaviti t. zv. dioptrický mikroskop. Tento sestává ze dvou bikonvexních čoček, jejichž optické osy se kryjí v jedné linii (tvoří společnou

osu). Čočka A (obr. 6.), která jest blíže předmětu, nazývá se objektiv, čočka B , kterou pohlížíme na obraz čočkou A vytvořený, nazývá se okulár (očnice). Z předmětu a, b , který nalézá se za ohniskem silně vypouklé čočky, vznikne skutečný převrácený obraz $a' b'$, který možno na mdlou desku zachytiti. Očnicí B díváme se na obraz $a' b'$, který byl promítnut mezi ohnisko a čočku

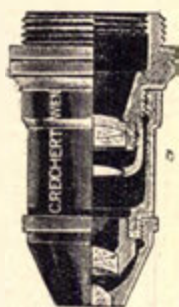


Obr. 6.

okuláru, a tímto okulárem zvětšíme skutečný obraz objektivem povstaly ($a'' b''$).

Mikroskopické objektivy.

Objektiv mikroskopu, jak možno nejlépe se přesvědčiti na průřezu (obr. 7.), sestává z několika čoček různě broušených a různého zakřivení. Všecky čočky dohromady tvoří jednu bikonvexní čočku o malé optické délce, a všecky musí býti sestaveny v jedné a téže ose. Takto sestavená čočka musí vytvořiti skutečný obraz předmětu, který se nalézá za ohniskem.



Obr. 7.

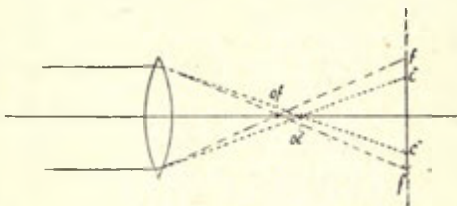
Jak již bylo uvedeno, všecky paprsky, dopadající na čočku, mají se lámati v ohnisku. Praxe však ukázala, že tomu tak není. Tato fyzikální poučka platí jen pro čočky s velice malým zakřivením, totiž pro ty, které představují úseky koulí o velikých poloměrech, nebo pro čočky velice tenké. Při čočkách s malým poloměrem, velice zakřivených, vidíme, že paprsky procházející okrajem čočky, lámou se daleko více než paprsky blíže optické osy procházející. U čoček takto sestavených nevytvoří se jedno ohnisko, nýbrž celá řada ohnisek, vlastně ohniskový prostor.

Následkem toho není obraz čistý, zřetelný, a čím větší zakřivení, tím ostrosti a zřetelnosti ubývá. Vadu tuto nazýváme sferickou aberací. Této vadě možno odpomoci různým broušením jednotlivých čoček o různých poloměrech, nebo zmenšením uhlu otevření čočky (to jest úhel, jehož vrcholem jest ohnisko a jehož ramena tvořena jsou paprsky jdoucími okraji čočky).

Však tím, že zmenšíme úhel otevření, totiž tím, že odstraníme veškeré paprsky okrajem čočky procházející, ztrácíme velice mnoho na světle. Tak jedno zlo nahrazujeme druhým, a poněvadž zvětšením ubývá světlosti v kvadratickém poměru, nutno při silném zvětšení použítí co možno největšího otevření uhlu, aby předmět byl dostatečně osvětlen.

Dříve již bylo uvedeno, že veškeré paprsky, procházející bikonvexní čočkou, lámou se do ohniska; nebyl však brán zřetel k tomu, že se tak děje jen s paprsky světelnými.

nými a že každý světelný paprsek jest složen z různých barevných paprsků, ze kterých má každý jinou délku vlny. Čočku možno považovati za systém hranolů, při prostupu lámou se paprsky a vytvoří celé barevné vidmo, z nichž paprsky červené lámou se nejméně, fialové nejvíce (obr. 8.). Následkem toho utvoří se pro různé barevné paprsky různá ohniska, povstává několik ohnisek, obrazy předmětu se tudíž nekryjí přesně, při čemž obdržíme na okrajích obrazu barevné orámování. Tuto vadu okrajového zabarvení nazýváme *chromatickou vadou*. Této vadě dá se odpomoci spojením dvou čoček, a to jedné bikonvexní a jedné konvex-konkávní, z nichž každá jest zhotovena z jiného skla, a to jedna ze skla korunového, druhá flintového. Poněvadž každé sklo má jiný lom, vyrovná se poněkud vzájemně lomivost paprsků, a čočka stává se *achromatickou*.



Obr. 8.

Touto kombinací různě broušených a z různého skla sestavených čoček koriguje se vada chromatická. Vidíme-li u takto kombinovaných čoček, hlavně za dopadu poněkud šikmo napadajících paprsků, modravou část spektra na okrajích, tu pravíme, že čočka jest *překorigována*, vidíme-li však, že převládá červená nebo žlutá část spektra na okrajích, pak jest čočka *podkorigována*.

Čočky, u nichž jest dle možnosti odstraněna jak sferická, tak i chromatická vada, nazýváme *čočkami aplanatickými*. Vada sferická není však u takto kombinované lupy aplanatické úplně odstraněna pro všechny paprsky na čočku dopadající, nýbrž jen pro paprsky dopadající v určitém uhlu. Čočka aplanatická má 2 body, pro které jest *aplanasie* úplně vyrovnána a které nazýváme *aplanatickými ohnisky jedné čočky*. Pro všechny ostatní paprsky, dopadající v jiném směru, pod jiným uhlím, jest čočka buď pře- nebo podkorigována.

Kombinace čoček.

Vezměme kombinaci tří čoček, střední bikonvexní ze-
vních plankonkávních, tu vidíme, že obě ohniska nalézají

se na téže straně čočky, a proto hodí se tato kombinace pro obyčejné lupy. Je-li kombinace taková, že vnitřní čočka jest bikonkávní a obě zevní bikonvexní, tu aplana-tická ohniska jsou na různých stranách čočky, a této kombinace se s výhodou užívá pro projekční aparáty. Aby se vyrovnala tato vada, musela by různá skla (flintové a korunové) a jich lomivost býti taková, aby paprsky procházející konkávní čočkou, která láme paprsky v opač-ném směru než bikonvexní, v každém bodě obou čoček navzájem si odpovídajících byly lámány úplně souběžně. Paprsky v konvexní čočce poblíž okraje lámou se nejvíce, musely by se tedy v čočce konkávní lámati nejméně, a opět ve středu, kde jsou lámány nejméně, musely by se v konkávní čočce lámati nejvíce, aby se vyrovnal lom obou míst jak na okraji, tak i v centru. Poněvadž ale lom a rozklad paprsků na barevné spektrum není souběžný, tu docházíme k tomu, že čím dokonaleji odstraníme vadu chromatickou (různým sklem, broušením), tím více zvětšu-jeme vadu sferickou a naopak. V praxi není možno docíliti naprostého odstranění obou vad. *Abbé* nazývá tuto vadu, která povstává odstraněním chromasie pro všechny pa-prsky mimo centrální na úkor vady sferické, chroma-tickou *differenti sferické aberace*. Avšak i této vadě hledí se odpomoci, a to kombinací čoček v horní a dolní polovině objektivu. Každá z této poloviny musí býti pro sebe korigována. Odstraní-li se sferická vada, zbývá ještě chromatická; střed jest vyrovnán, ale poněvadž modré pa-prsky dávají větší obraz než červené, vidíme na okraji modré zabarvení, díváme-li se obyčejným okulárem do mikroskopu. Aby se této chromasii odpomohlo, staví se okuláry tak, že kombinací čoček v okuláru zvětší se obraz paprsků červených více než modrých a pak oko vnímá obraz nezbarvený. Okuláry tyto, poněvadž kompensují určitou vadu, nazývají se okuláry kompenzační. Těchto okulárů používá se při objektivěch apochromatických a bývají vždy hotoveny k určitým objektivům, aby sku-tečně kompensovaly jejich vadu.

Numerická apertura. — Rozlišovací schopnost objektivu.

Velmi důležitou složkou v mikroskopii jest t. zv. rozlišovací schopnost objektivu, která jest odvislá od nu-merické apertury. K správnému pochopení této num.

aper. nutno si uvědomiti, že mikroskopické vyšetření děje se hlavně za prostupujícího osvětlení, při čemž vyšetřované objekty jsou průsvitné. Prostupující paprsky dopadají na preparát, jsou na neprůsvitných místech zadržovány, na jiných místech jsou částečně propouštěny. Leč většina paprsků na okrajích různých tkání, (které tvoří jakési mřížkování), se láme, dochází k lomu a interferenci svazců světelných paprsků, které vytvoří celé duhové spektrum. Jde tudíž o centrální bílý svazek světelný a kolem něho o svazečky různě silně lámaných paprsků, které vytváří barevné spektrum. (Velmi dobře možno tento úkaz pozorovati při silnějším zvětšení na „pleurosigma angul.“ a jiných diatomaceích, jichž pancíř sestává z velice jemného mřížkování. Odstraníme-li okulár a pohlížíme-li do mikroskopu, tu vidíme nad objektivem obraz, kde vedle čistě bílých míst spatříme nejkrásnější duhové zbarvení.) Jak *Abbé* dokázal, možno jen tehdy docílití přirozeného obrazu velmi jemných struktur mikroskopických, když vedle centrálního svazku světelného i okolní uchýlené svazečky jsou zachyceny objektivní čočkou.

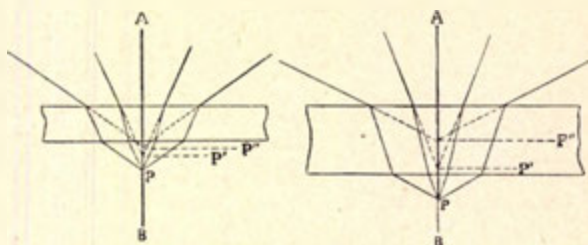
Čím jemnější struktury nalézáme v preparátech, tím více se světlo na strany láme, a tu jest jasno, že rozlišovací schopnost objektivu jest závislá od úhlu tvořeného optickou osou a okrajovými paprsky, které může objektiv ještě zachytiti (úhel otevření objektivu). Dle *Abbého* jest rozlišovací schopnost složitého mikroskopu úměrná sinu z poloviny úhlu otevření objektivu. Tento poměr se zove „numerická apertura objektivu“. Numerická apertura jest tudíž měrou rozlišovací schopnosti objektivů. Je-li U úhel otevření, n index lomu prostředí mezi skélkem a objektivem, tak jest $n. a. = n \cdot \sin \frac{U}{2}$. Pravidlem se počítá

již předem s polovicí sinu úhlu otevření a značí se apertura $= n \cdot \sin U$. U suchých objektivů, kde nalézá se mezi skélkem a objektivem vzduch, může býti apertura na nejvýše 1, praktické použití vykazuje však apert. 0.95. U vodní immerse, kde jest index lomu vody 1.33, může býti apert. nejvýše 1.15, u homogenní immerse, kde za prostředím slouží cedrový olej, jehož index lomu jest 1.515, jest apertura 1.40. Použijeme-li šikmého osvětlení preparátu, možno rozlišovací schopnost objektivu ještě zvětšiti. Obdržíme-li při obyčejné apertuře objektivu nejmenší dosažitelnou jasnost elementů 0.0004 mm, možno při šikmém

osvětlení dosáhnouti ještě ostrosti elementů 0.0002. Tohoto šikmého osvětlení možno použití jen ve speciálních případech.

Jaký vliv má krycí skélko na prostup světelných paprsků?

Paprsek světelný, odražený od zrcadla, dopadá na skélko, a poněvadž přichází z prostředí řidšího (vzduchu) do hustšího (skla), uchýlí se ke kolmici, při výstupu do vzduchu láme se od kolmice (obr. 9.). Na obraze vidíme, že čím šikměji dopadá světelný paprsek na spodinu skla, tím více se uchyluje při výstupu. Prodloužíme-li si směr vystupujících paprsků, vidíme, že paprsky blíže středu



Obr. 9.

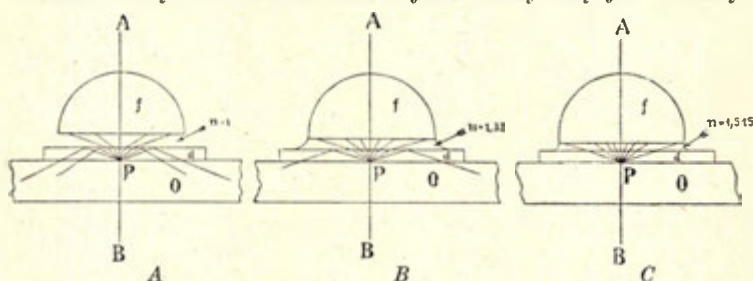
prostupující protínají se se střední osou v místech níže uložených (p') než paprsky šikmé p'' , a styčné body budou tím výše uloženy, čím paprsky jsou šikmější. Tím povstává celá řada bodů, totiž obraz protažený od středu k okraji, t. j. dochází rovněž ke sferické aberraci. Avšak srovnáme-li lom paprsků ve spojce, kde dochází ke sferické aberraci, vidíme, že paprsky blíže okraje prostupující více se lámou a obraz zdá se býti uložen hlouběji, čím blíže k centru, tím méně se lámou a obraz se jeví výše, tudíž pravý opak od lomu ve skélku krycím; působí tedy sklo na preparátě přímo překorigování objektivu.

Z obrazu tohoto jest zároveň jasno, jak mnoho světla od zrcadla odraženého přichází na zmar. Uchýlených paprsků nemožno využití na osvětlení preparátu, neboť veškeré šikmo dopadající paprsky minou čelní čočku objektivu. Zavedením osvětlovacího přístroje, Abbéova kondensoru, odpomůže se této vadě. Paprsky od zrcadla odražené dopadnou

na spojku kondensoru a zde, jsouce do ohniska lámány, vytváří mohutný kužel světelný, který osvětlí pozorovaný předmět.

Vliv prostředí mezi krycím skélkem a objektivem.

Obráz 10. znázorňuje průběh paprsků, které prostoupily preparátem a krycím skélkem u různých objektivů, a to: *A* — u objektivu suchého, *B* — u vodní immerse, *C* — u homogenní immerse. U všech světelné paprsky prostoupí stejně; u suchého objektivu, jak vidno, nejkrasnější paprsky nepřicházejí do čelní čočky, nýbrž jsou úplně reflektovány. U vodní immerse jsou zachyceny již všechny



Obr. 10.

střední paprsky i okrajové, až na nejkrasnější. U homogenní immerse veškeré označené paprsky mohou být po jaty do čelní čočky objektivu, poněvadž se neuchýlí na své cestě procházejíce mediem, — cedrovým olejem — které má skoro tentýž lom jako sklo.

Prohlížení preparátu immersí.

Při silném zvětšení — immersí vodní nebo homogenní (olejovou) — jest nutno mezi čelní čočku objektivu a preparát vsunouti kapku cedrového oleje (při vodní immersi — kapku vody), z té příčiny, aby bylo zamezeno uchýlení paprsků preparátem prostoupých. Cedrovým olejem, který má přibližně tutéž lomivost jako sklo, prostoupí paprsky světelné, aniž by se uchýlily, a světelný kužel skrze preparát do objektivu vnikající nedozná žádného zeslabení. Při osvětlení pro immersí má se použití plochého zrcadla, při preparátech zbarvených (bakteriích) zároveň plného otevření kondensoru.

Zvětšení v mikroskopu.

Zvětšení v mikroskopu jest závislé pouze na objektivu; tento zvětšuje — správněji rozlišuje — jednotlivosti v předmětu. (Rozlišování jest závislé na svazečcích světelných.) Obraz povstálý objektivem jest velmi malý a proto nutno na obraz pohlížeti okulárem, který reální obraz objektivu zvětší — rozšíří — a usnadní pozorování. Okulár působí podobně jako projekční přístroj. Diapositiv možno různě zvětšovati projekčním přístrojem, buď použitím různě silných čoček projekčních nebo zvětšením vzdálenosti projekční desky od aparátu. Právě tak možno změnou okuláru nebo prodloužením tubusu u mikroskopu změnit zvětšení obrazu. Různým zvětšením nepostřehneme však více jednotlivostí a detailů, než kolik jich vidíme na diapositivu nebo na obraze povstalém objektivem. Jen to, co objektiv v mikroskopu rozlišil, možno okulárem rozšířiti za příčinou zřetelnějšího vidění.

Zorné pole objektivu.

Každý objektiv má své zorné pole. Obr. 11. nás nejlépe poučí o jeho průměru (obrazy jsou mikrofotografie mikrometru, pořízené ve výši tubusu, kde vzniká reální obraz, v přirozené velikosti).

| | | | | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|------|------|--|
| Čís. objektivů | | | | | | | | |
| (Reichert) . . . | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 | 12 | |
| Zorné pole v mm | | | | | | | | |
| (Průměr) . . . | 4.5 | 2.3 | 1.65 | 0.63 | 0.53 | 0.39 | 0.23 | |
| Zmenšení zorného pole nasazeným okulárem*) čís. | | | | | | | | |
| III. v mm . . | 3.3 | 1.65 | 1.2 | 0.46 | 0.39 | 0.28 | 0.17 | |
| Vlastní zvětšení objektivu . . . | 3.6× | 7× | 16× | 39× | 46× | 68× | 100× | |
| Vlastní zvětšení okuláru čís. . . | I | II | III | IV | V | VI | VII | |
| | 3× | 4× | 5.5× | 7× | 9× | 12× | 20× | |

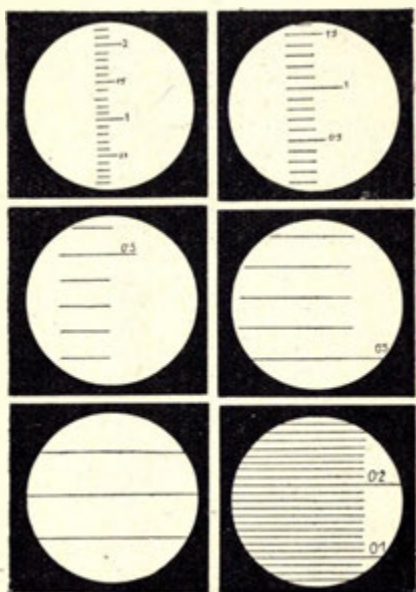
Známe-li vlastní zvětšení objektivu a okuláru, tu možno si lehce vypočítati skutečné zvětšení v mikroskopu.

* Nasazením okuláru zmenší se zorné pole následkem vloženého stínítka mezi obě čočky okuláru.

Objektiv 4 má vlastní zvětšení 16, okulár III 5·5, tu obdržíme zvětšení $16 \times 5·5 \dots 88$, tudíž přibližně $90 \times$.

Pro praktickou potřebu jest vždy nutno vyjádřiti při vyobrazení, jakého objektivu a okuláru bylo použito, a neudávati zvětšení v číslech. Tak na př. údaj zvětšeno $100 \times$ nic nepraví, neboť tohoto zvětšení mohu dosáhnouti všemi objektivy, pozměním-li okulár, při tom jest mi známo, že objektiv 2 nebo 3 nerozliší mi předmět tak, jak obraz vykazuje.

Jak z uvedeného vysvítá, jest zvětšení v mikroskopu závislé na rozlišovací schopnosti objektivu, totiž na velikosti numerické apertury. Z té příčiny nutno přenést zvětšení na objektiv. Pro větší zvětšení nutno vždy použiti silnějšího objektivu a slabšího okuláru, ale nikdy ne naopak. Při slabších objektivěch a silnějších okulárech neobdržíme nikdy ostrých obrazů jemných struktur. Pro obyčejné prostupující světlo jsou veškeré objektivy upevněny na tubusu určité délky, a to 160 mm. Na tuto délku jsou veškeré objektivy přesně zařízeny.



Obj. 3 Obr. 11. Obj. 4
 „ 5 „ 6
 „ 8 „ 12

Rovněž tak všechny objektivy jsou sestaveny pro určitou tloušťku krycích sklélek a to: 0·17—0·18 mm. U slabých objektivů suchých neshledáme žádné újmy na ostrosti, použijeme-li tlustších sklélek, avšak pro střední a silné objektivy nutno uvedenou tloušťku dodržeti (u achromátů od č. 5 výše, u apochromátu od 8 mm).

Prodloužením tubu možno poněkud korigovati vadu vzniklou tloušťkou skélka (u tlustších sklélek tubus vsuneme — zkrátíme — u slabších prodloužíme — vysuneme). Jinak opravíme uvedenou chybu u silných suchých

objektivů a u vodní immerse zařízením objektivů s korekčním kruhem (viz str. 30.).

Pro běžnou potřebu uvádíme tabulku, kde jsou zaneseny hodnoty dílků okulárního mikrometru (okulár II s mikrometrem, 1 mm dělen na 10 dílků) pro různé *achromatické* objektivy. Pro objektivy *apochromatické* užívá se mikromilimetru v okuláru 6.

Fa Reichert.

Achrom. objektiv.

| | <i>mm</i> |
|----------------------|-------------|
| 00 | 0·0694 |
| 0 | 0·0494 |
| 1a 1c | 0·0410 |
| 1b | 0·06—0·0473 |
| 1 a 2 | 0·0338 |
| 3 | 0·161 |
| 4 | 0·0098 |
| 4b | 0·0092 |
| 4c | 0·0121 |
| 5 | 0·0046 |
| 5b | 0·0092 |
| 6 | 0·0032 |
| 6b | 0·0036 |
| 7a | 0·0028 |
| 8a | 0·0023 |
| 8a* | 0·0025 |
| 18b** 1/12 | 0·00158 |

Apochromáty
(mikrometr okulární VI).

| | |
|------------------|---------|
| 16 mm | 0·0137 |
| 8 mm | 0·0079 |
| 4 mm | 0·0035 |
| 3 mm | 0·00256 |
| 2 mm | 0·00164 |
| 1·5 mm | 0·00127 |

Fa Leitz.

Achromaty.

| | <i>mm</i> |
|--------------------|-----------|
| 0 | 0·133 |
| 1 | 0·0487 |
| 2 | 0·0274 |
| 3 | 0·0153 |
| 4 | 0·0085 |
| 5 | 0·0050 |
| 6 | 0·0035 |
| 7 | 0·0025 |
| 1 (7..) vodní imm. | 0·003 |
| 1/1 2 | 0·0016 |

Apochromáty
(okulár VI).

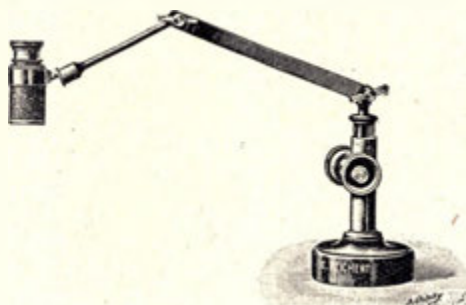
| | |
|-----------------|---------|
| 16 mm | 0·0146 |
| 8 mm | 0·0076 |
| 4 mm | 0·0037 |
| 3 mm | 0·00268 |
| 2 mm | 0·0018 |

Poněvadž však broušení a stavba různých objektivů není téměř nikdy naprosto stejná, jest nutno pro důležitá měření použití objektivního mikromilimetru a zjistiti předem hodnotu dílků mikrometru okulárního při různém výťahu tubu s dotýčnými objektivy. (Viz také str. 40. Přesné měření.)

II. Mikroskop a přístroje pomocné.

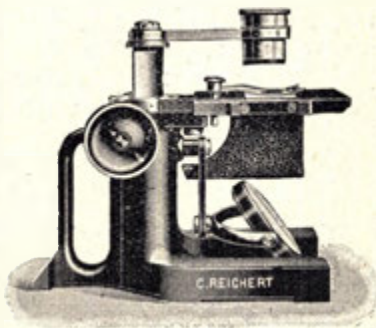
Optické přístroje.

Nejjednodušší optický přístroj, kterého se používá k zvětšení, jest lupa. Používáme vesměs lup aplanatických, které dovolují zvětšení 2- až 15násobné. Lupy jsou



Obr. 12.

uloženy do kovové neb rohové objímky, ke které jest připevněno držátko (obr. 12.). Jiné zařízení záleží v tom, že lupa s objímkou je připevněna na ozubenou lištnu, která jest připevněna na pevném stojanu; ozubeným kolečkem jest možno lištnu a s ní spojenou lupu do různé výšky zastaviti. Na stojanu jest připevněn stolek se skleněnou deskou, pod kterou jest umístěno ploché zrcadlo. U některých přístrojů jsou ještě zavěšena po stranách opěradla pro ruce pracujícího (obr. 13.). Takto zařízené lupy jsou vedeny pod názvem pracovních či preparačních lup (t. zv. jednoduché mi-



Obr. 13.

kroskopy). Tyto jsou tak zhotoveny, že možno u nich lupy vyměňovati a tak docíliti zvětšení až 100násobného. Těchto pracovních lup užívá se ponejvíce v zoologii, botanice a jsou ještě pro speciální práce opatřeny různým zařízením.

Nasadíme-li jednoduchou aplanatickou lupu na delší rouru, a nalézá-li se pozorovaný předmět mezi ohniskem čočky a čočkou, tu objeví se v rouře zvětšený převrácený obraz předmětu, který možno na mdlou desku zachytiti: položíme-li na horní okraj roury novou čočku — spojku — tu zvětšíme si obraz lupou vzniklý, a tak docházíme ke složitému mikroskopu v nejjednodušší formě. Obraz předmětu ve složitém mikroskopu jest obdobný s obrazem v rovném zrcadle — obraz obrácený.

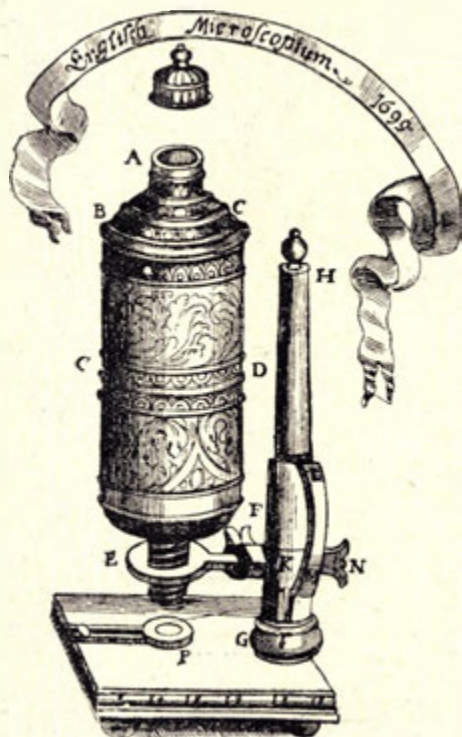
Drobnohled. (Mikroskop.)

Velice zajímavá jest historie a vývin mikroskopu a srovnání mikroskopu moderně vypraveného s mikroskopem století 17. a dříve (obr. 14.). Není však třeba ani tak nazpět pohlížeti; srovnajme jen mikroskop z let šedesátých min. stol. Hlavní snahou při konstrukci mikroskopu bylo zlepšování optického zařízení, které se neustále zdokonalovalo. Největší zásluha dnešního zdokonalení mikroskopu náleží neúnávnému badateli prof. A b b é m u po stránce fysikální, na druhé straně pak zdokonalování druhů skel, ze kterých se čočky pro mikroskop zhotovují.

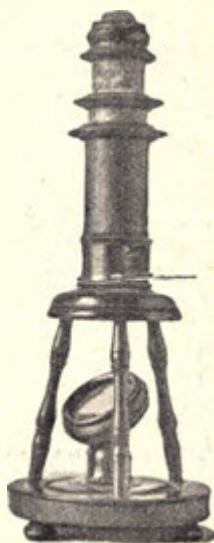
Různé firmy vyrábějí různě sestavené mikroskopy. V principu skládají se vesměs ze stativu, který spočívá na těžké noze. Na stativu jest upevněn podložní stolek, který má uprostřed otvor, kudy prochází světlo od zrcadla pod stolek umístěného odražené. Tímto zrcadlem, které bývá pravidelně na jedné straně rovné, na druhé duté, možno v různých polohách pohybovati. Horní část stativu nese objímací rouru, ve které se posunuje t. zv. tubus, na který se připevňují čočky. Do horního konce tubusu vsouvá se okulár — očníce, na dolejší konci připevní se objektiv.

Při tomto jednoduchém zařízení mikroskopu musí se tubus při mikroskopování zasouvati do žádané vzdálenosti objektivu od preparátu, takže tubus pohybem v podélné ose otáčivým pozvolna vsunujeme dolů a cvikem možno odhadnouti, do jaké vzdálenosti možno při tom

kterém objektivu tubus k preparátu přiblížiti. Nesmí se nikdy tubus přímo od shora dolů tlačiti, tím mohli bychom nejen preparát, ale i objektiv nárazem zničiti. Při každé výměně objektivu nutno tubus opět šroubovitě nahoru vysunouti, objektiv z tubusu vyjmouti, nový vsaditi a opět šroubovitě opatrně dolů posunouti. Jemné zastavení děje se t. zv. mikrometrickým šroubem.



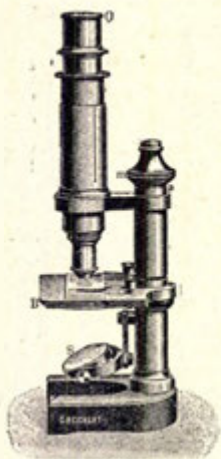
Obr. 14.

Obr. 15. Původní snímek
drobnohledu J. Ev. Purkyně
z dob studijních.

Do otvoru ve stolku, kterým světlo prochází, možno vkládati vložky s otvorem různého průměru. Vložky ty nazýváme clonky — stínítka. To jsou t. zv. válcová stínítka. U některých mikroskopů nevkládáme těchto vložek; namísto nich nalezneme pod stolkem excentricky uloženou kruhovou desku s různě velkými otvory, kterou možno otáčeti, a použijeme pak clonky dle libosti (obr. 16.).

Takovéto jednoduché mikroskopy vyrábějí dosud veškeré firmy, a má-li mikroskop takový dobře seřízené optické zařízení, hodí se ke všem drobnohledným pracím, ovšem ztrácí pracující mnoho času při výměně objektivů a vsouvání tubusu. Těmto nevýhodám hledělo se odpomoci různými změnami na konstrukci přístroje.

První úprava záležela v tom, že bylo odstraněno ruční posouvání tubusu tím, že na tubus připevněna byla ozubená lištna, do které zapadá ozubené kolečko, kte-



Obr. 16.



Obr. 17.

rým možno tubus posouvatí nahoru a dolů. Tím jest usnadněno hrubé zastavení objektivu ku preparátu. Bylo shledáno, že osvětlení jednoduchým zrcátkem jest velice slabé, hlavně při silnějším zvětšení. Proto byl zřízen osvětlovací přístroj, který se skládal z jednoduché, silně vypouklé čočky, t. zv. kondensoru, který se vsunul do otvoru ve stolku. Světlo, od zrcadla odražené, se lámalo v kondensoru a mohutný kužel světelný osvětlil preparát. Stínítka nad kondensorem zůstala.

Mnohé mikroskopy byly příliš vysoké a pozorovatel musil se namáhati a mikroskopovati v nepřírozeném položení a sehnutí hlavy. Tato vada odstraněna tím způsobem,

že stativ možno kolem nýtu v místech stolku se nalézajícího do různé polohy sklopiti a v této poloze upevniti (obr. 17.).

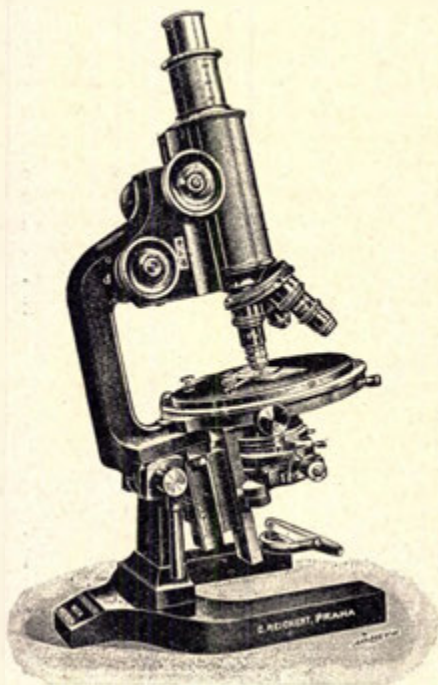
Velkou důležitost při mikroskopování má osvětlení. Děje-li se toto osvětlení pouze odrazem od plochého zrcadla, tu jest pro silnější zvětšení toto osvětlení velice nedostatečné; poněkud bylo tomu odpomoženo vložním kondensorem. Avšak ani tato jednoduchá čočka nestačila.

Profesor Abbé sestavil zvláštní osvětlovací přístroj, který se také po něm nazývá, a který umístěn jest pod stolkem mikroskopu. Tento přístroj sestává z kombinace čoček velice krátkého ohniska, které světlo od zrcadla odražené spojí v světelný kužel osvětlující preparát. Pod čočkami jest irisové stínítko, které se skládá z poloměsíčkovitých kovových plotének, excentricky na čepích se pohybujících, které posunutím vytvoří dohromady různě velký otvor. Tuto irisovou clonku možno též stranou posunouti. Při normálním položení stínítka obdržíme osvětlení centrální, posunutím osvětlení šikmé; vyloučí se totiž paprsky světelné, procházející osou čočky.

K tomuto osvětlovacímu přístroji přidána jest ještě clonka paprskovitá, která má malé plné kolečko, tenkými loukotěmi upevněné. Touto clonkou, vloženou do přístroje, vyloučí se veškeré paprsky centrální, čímž zatemní se zorné pole, a pouze paprsky procházející po stranách osvětlí určitá místa a obdržíme t. zv. „osvětlení temného pole“, kde zorné pole jest tmavé a předmět je osvětlen. Této clonky jest možno použití jen při slabším zvětšení. Plného světla, totiž úplného otevření irisového stínítka, použijeme jen při vyšetřování silně zbarvených, malých částí objektu, jako jsou preparáty bakterií nebo struktura plasmatu. Jinak nutno vždy použití stínítka, bychom určitou část světelného kužele vyloučili. Při plném světle nastává přesvětlení, takže při histologickém vyšetřování ztrácí se veškerý detail v preparátě, který při zatahování stínítka vždy ostřeji vystupuje. Jak daleko se může světlo zeslabiti, rozpoznáváme při mikroskopování. Jemné zastavení mikrometrickým šroubem doznalo také různých změn u různých výrobců, hlavně po stránce jemnosti a umístění šroubu.

U starších jednoduchých mikroskopů, jak již dříve bylo uvedeno, bylo nutno při každé výměně objektivu vyjmouti tubus, odšroubovati objektiv a jiný opět nasa-

dití, což vyžadovalo dosti cviku a času. Následkem častého vysunování a vkládání tubusu se stávalo, že mikroskop nebyl centrován, t. j. že objektiv neodpovídal úplně centrálnímu místu v zorném poli. Při práci slabým objektivem zastavilo se určité nepatrné místečko do centra; slabší objektiv byl zaměněn silným, mělo-li býti analysováno ono místo při silném zvětšení, a tu pravidelně ne-



Obr. 18. Největší model mikroskopu s úplným zařízením.

bylo možno místa toho po vsunutí tubusu naléztí, jelikož ocitlo se úplně stranou zorného pole. Této vadě odpomohlo se s velice dobrým výsledkem zavedením t. zv. „revolveru“. Přístroj ten jest našroubován excentricky na tubus a na něm přišroubovány jsou dva nebo tři objektivy; při otočení revolveru postaví se objektiv na pravé místo. Tak možno rychle střídati objektivy, aniž bychom byli nuceni pohybovati tubusem (obr. 18.). Na okraji revolveru nalézá se zpruha, která nese zoubek, jenž zapadne do výřezu vždy v tom místě, kde jest objektiv k mikroskopu centrován. Jako s každou částí mikroskopu, ale hlavně s jemným mikrometrickým šrou-

bem, tak i s revolverem jest nutno velice opatrně zacházeti, nemá-li býti poškozen.

Zajisté bude na místě, zmíníme-li se o tom, že jsou drobnohledy k různým vyšetřováním též různě stavěny. Tak na př. u drobnohledů, kterými možno vyšetřovati veliké řezy, na př. celým mozkiem člověka, jedná se o takové zařízení, abychom mohli podložní skélko preparátu

umístiti na stolku mikroskopickém. Proto musí býti stolek značně rozsáhlejší než u obyčejných mikroskopů. Pro tento případ jsou sestaveny zvláštní mikroskopy na př. na prohlížení mozkových řezů. (Nachet, Reichert, Zeiss atd.)

Též optická část jest vzhledem k vyšetřování jinak zařízena; jde o objektivy, které mají velké zorné pole, aby se mohla větší část preparátu najednou přehlédnouti.

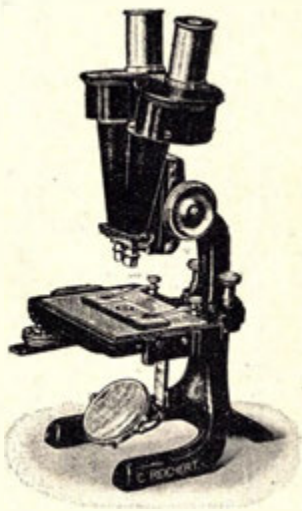
Dále sestaven jest mikroskop pro vyšetřování petrografické. Pro vyšetřování neprůhledných předmětů sestaven jest t. zv. metalurgický mikroskop, při kterém jest vsunut do tubusu zvláštní přístroj, t. zv. *illumina-
tór*, který prismaticem a čočkou vrhá světlo na plochu, která se má vyšetřiti (výbrus železa a p.). Tohoto zařízení používá se nyní s velikým prospěchem v soudní medicíně, kde se mohou mikroskopicky rozpoznati velice zřetelně na nástroji, na př. noži, skvrny krevní od skvrn rezu, bez porušení *corpus delicti*.

Stereoskopický mikroskop.

Stavba mikroskopu pro stereoskopické vidění byla různým způsobem řešena. Anglický výrobek (Beck, Londýn) pozůstával v tom, že pořízení dvouokulárový mikroskop, jenž měl dva sbíhavé, do jedné společné roury ústící tubusy s jedním objektivem, nad kterým bylo umístěno hranolové zařízení. Jeden obraz procházel objektivem přímo do prvního okuláru, hranolem procházející obraz byl pak uchýlen do druhého tubusu ke druhému okuláru.

Později byl sestaven mikroskop dle *Greenougha*. Tento dvouokulární mikroskop má též dva sbíhavé tubusy, ale se dvěma objektivy. Jak objektivy, tak i okuláry, musí býti naprosto identické (obr. 19.).

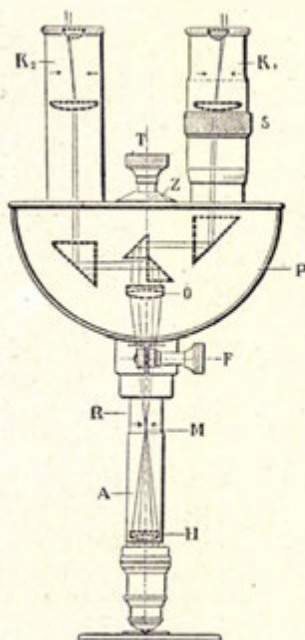
Nověji jest stavěno stereoskopické zařízení podle



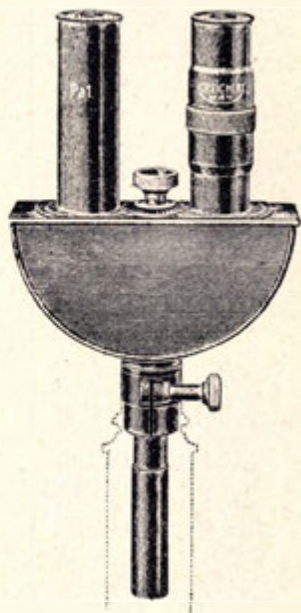
Obr. 19.

Heimstaedta; jest to dvouokulárový stereoskopický nástavek, který možno na každý stativ nasaditi. Umožňuje stereobrazy při každém zvětšení (i při immersii) (obr. 20.). Tohoto nástavku možno použití, po připojení na zvláštní podstavec, jako stereolupy, nasadí-li se naň slabé objektivy (obr. 21.).

Veškeré mikroskopy jsou v principu stejně sestaveny; různá zařízení, jak nalézáme u různých mikroskopů, jsou



B
Obr. 20.



A
Obr. 21.

jen obměny, kterých sobě někteří badatelé přáli. Tak na příklad nalezneme mikrometrický šroub na různých místech umístěný, jednou nalézá se nahoře stativu, jindy po straně téhož, někdy opět na jeho dolním konci.

Pro pohodlné demonstrování preparátu druhé osobě slouží zařízení provedené na okuláru, kde od tohoto odbočí stranou roura s druhým okulárem. Obraz povstálý objektivem se ve výšce okuláru vloženým hranolem uchýlí do

druhého okuláru postranního a tak umožněno, že dvě osoby mohou zároveň preparát prohlížeti. Takových a podobných obměn najdeme celou řadu, neboť různé firmy hledí neustále své přístroje zlepšovati a učiniti tak badání mikroskopické po technické stránce pohodlnějším.

Čočky.

Optickou část mikroskopu tvoří čočky, a to objektivy a okuláry.

Jak jsme již ve všeobecné části (str. 10, 11) „o lomu světla“ uvedli, u každé jednoduché čočky (spojky) nacházíme dvě vady, totiž vadu kulovitou či sférickou a chromatickou, barevnou. Sférická vada vzniká tím, že paprsky, které čočkou procházejí, nejsou stejně lámány; paprsky procházející blíže okrajů čočky jsou více lámány, než ony, které procházejí blíže středu. Tím povstává zkreslení obrazu, tak zv. úchylna či vada sférická. Vada chromatická spočívá v tom, že světlo čočkou prostupující rozloží se podobně jako v hranolu v barevné součásti vidma.

Paprsky fialové lámou se nejsilněji, paprsky červené nejslaběji; tím spojí se paprsky fialové brzy za čočkou, červené mnohem dále od ní a ostatní zůstávají v různé vzdálenosti mezi oběma. Výsledek toho jest, že tvoří se na pokračí čočky barevné kruhy.

Vadě chromatické odpomáhá se tím, že spojí se dohromady dvě čočky z různých druhů skel zhotovené, ze skla korunového a flintového. Oba druhy skla mají různou schopnost lámání barevných paprsků a chyby, zavinené lomem jednoho skla, vyrovnávají se vadou skla druhého. Čočku takovou, která povstává kombinací dvou různých skel, nazýváme čočkou achromatickou. Touto kombinací odpomáhá se do jisté míry i vadě sférické, čímž povstane t. zv. čočka aplanatická.

Jest ještě důležité upozorniti na t. zv. úhel otevření; takto nazýváme trojúhelník, jehož vrchol jest ve středu pozorovaného předmětu, výšku tvoří vzdálenost předmětu od čočky a základnu tvoří její průměr. Použijeme-li clonky, jest tento úhel zmenšen (viz str. 13.).

Okuláry.

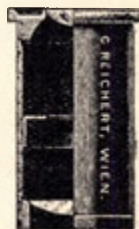
Okuláry zhotovují se kombinací dvou čoček. Při obyčejných achromatických objektivěch užívá se t. zv.

„Huygenských“ okulárů, které přicházejí pod značkami I.—V. dle různé délky ohniska. (Obr. 22.) Pro objektivy apochromatické jsou sestaveny zvláštní okuláry t. zv. „kompensační“. (Obr. 23.) Účelem kompenzačního okuláru jest korigovati chromatickou vadu u objektivu a jest tudíž jaksi stanoven pro každý objektiv určitý okulár; jen tyto dvě určité kombinace dají naprosto achromatický



Obr. 23.

obraz. Těchto okulárů možno však i při achromatických objektivěch použití. Do obchodu přicházejí pod značkami 2, 4, 6, 8, 12, 18, kterýmžto číslem jest zároveň vyjádřeno vlastní zvětšení dotyčného okuláru. Známe-li vlastní zvětšení objektivu (dle tabulek zvětšení), vypočteme lehce zvětšení dotyčného systému u mikroskopu; na př. Reichertův apochromat suchý 3 mm má vlastní zvětšení



Obr. 22.

85, s kompenzačním okulárem 4 dá zvětšení $85 \times 4 = 340$.

Pro práce mikrofotografické doporučuje se použití okuláru *periplanatického*, který má tu výhodu, že poskytuje širokého a hlavně naprosto rovného zorného pole. Tyto okuláry jsou podobně stavěny jako okuláry Huygenské, ale oční čočka sestává ze dvou čoček, jedné negativní, ze skla flintového, a jedné pozitivní čočky ze skla korunového. Používá se jich při silnějších objektivěch jak achro-, tak i apochromatických.

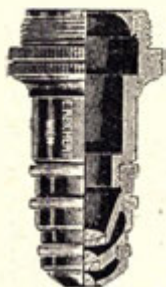
Projekční a mikrofotografické objektivy a okuláry.

Vedle uvedených objektivů a okulárů vyrábějí se ještě speciální t. zv. projekční objektivy, a to od 25 až do 75 mm ohniskové vzdálenosti, dále pak okuláry projekční č. 2 a 4. Těchto objektivů a okulárů používá se hlavně při mikroskopických projekcích a při fotografování z mikroskopu, leč možno jich též použití při obyčejném mikroskopování. Pro různá badání sestaveny jsou ještě jiné druhy okulárů, jako spektrální, polarisační, mikrometrický, goniometrický, stereoskopický atd. Dále jsou sestaveny okuláry, které dávají přímý obraz, převrátí totiž obraz objektivem v mikroskopu povstalý.

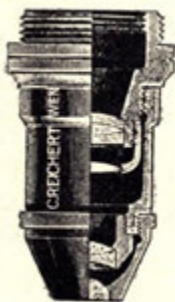
Objektivy.

Každý objektiv sestává z jedné nebo z několika různě zakřivených čoček z různého druhu skla zhotovených; mluvíme o systému objektivů. Při každém objektivu jest na jeho dolním konci čočka s nejkratší ohniskovou vzdáleností, kterou nazýváme „čočkou čelnou“ neboli „přední“. Při hotovení systému jest nejdůležitější a hlavní požadavek, aby veškeré čočky, z nichž objektiv jest složen, byly správně centrovány, t. j. aby osy jednotlivých čoček byly v jedné a téže přímce, tudíž v optické ose mikroskopu.

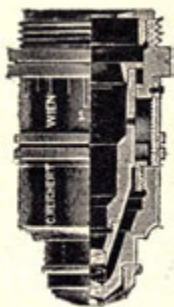
Při objektivu záleží hlavně na tom, aby dával co možná světlý achromatický obraz, při čemž musí býti vyloučena i vada sférická.



Obr. 24.



Obr. 25.



Obr. 26.

Objektivy jsou různě stavěny a uváděny pod různými názvy, a to: „achromatické, apochromatické a tvrdé apochromatické systémy“. Systémy achromatické sestávají z čoček, které jsou vyráběny ze skla silikatového, flintového a barytkorunového.

U objektivů t. zv. „tvrdých apochromátů“ používá se vedle kombinace čoček ze skla barytkorunového a flintového ještě z kazivce. Objektiv apochromatický má 1 až 3 čočky zhotovené z kazivce, ostatní skelné.

1. Achromáty. Tyto jsou složeny z čoček zhotovených z obyčejného skla korunového a flintového; jsou naprosto stále, nejsou porušovány vlivy atmosférickými a mají větší ohniskovou vzdálenost (obr. 24.).

2. Apochromáty. Mají před achromáty tu výhodu, že kombinací čoček zhotovených z kazivce a borsilikáto-

vého skla, které má menší lomivost, mají schopnost většího sběru a zhušťování světelných paprsků. Zároveň onou kombinací odstraněna jest téměř úplně „chromasie“ všech tří barev při použití kompenzačních okulárů; z té příčiny není radno používat u apochromátů obyčejných okulárů. Apochromáty dávají obrazy až do krajů velice čisté (obr. 25.).

3. Korrekční objektivy. Jak známo, nutno pro silnější objektivy použití krycích sklélek určité tloušťky. Užije-li se sklélek tlustších, možno této vadě odpomoci korrekčními objektivy. Tyto jsou sestaveny tak, že přední část čoček jest pevně montována na zevní objímce, druhá část uložena jest ve vnitřní otáčivé objímce, kterou možno korrekčním kruhem k přední části přiblížiti neb oddáliti. Na kruhu jsou uvedena čísla, která odpovídají setinám milimetru, a tu možno kruh zastaviti na tloušťku krycího skélka. Korrekce jest možná v rozpětí 0.10—0.20 mm (obr. 26.).

Objektivy označeny jsou buď jako suché nebo immersní (ponorné); immerse rozeznáváme vodní a homogenní (olejové). Máme-li pracovati immersním systémem, jest nutno mezi preparát a objektiv vsunouti buď kapku vody (při immersi vodní) nebo kapku oleje při homogenní.

Při homogenní immersi jest velice důležité, aby používáno bylo toho oleje, který dotyčná firma pro objektiv dodala, neboť záleží velice mnoho na lomu světla v tom kterém oleji, a tento lom má vždy odpovídati dotyčné konstrukci immersního objektivu.

Objektivy různých firem jsou též různě značeny. Tak na př. firma Reichert značí achromatické, suché objektivy číslicemi od 0 až do 9, vodní immersi 10, homogenní immerse 16—19. Různosti ve stavbě stejných objektivů jsou vyznačeny kromě číslice ještě písmenou, na př. 4, 4b, 4c. Písmenou opatřené objektivy mají větší vzdálenost ohniskovou.

Apochromatické systémy jsou označeny číslem vyjadřujícím vzdálenost ohniska, na př. 16 mm, 3 mm, homogenní immerse 2 mm. Vedle tohoto označení nalezneme ještě značku +, na př. homogenní immerse 1.5 + + +, to znamená, že v kombinaci tohoto objektivu se nalézají tři čočky z kazivce.

Firma Zeiss v Jenně značí achromatické objektivy písmenami *a, A, AA, B, C, D, E, F*, homogenní immerse pak zlomkem $\frac{1}{2}$.

Apochromatické objektivy značí se číslicemi, které zároveň udávají vzdálenost ohniska. Suché objektivy: 16, 8, 4, 3, vodní immerse 2·5, homogenní immerse 3, 2, 1·5. Síla zvětšení jest dána výškou čísla (Reichert), po případě místem písmeny v abecedě (Zeiss).

Menší značka (číslo) objektivu udává nám objektiv menšího zvětšení, na př. 1 jest zvětšení slabé, 4—5 prostřední, 8 silné zvětšení.

Vedle uvedených objektivů immersních nalezneme ještě objektivní systémy, t. zv. „Semiapochromáty“; rozdíl od „Apochromatického“ objektivu záleží v tom, že veškeré čočky, ze kterých objektiv jest složen, jsou broušeny ze skla, a to kombinace silikatového, flintového a barytového, není tudíž žádné čočky z kazivce. Tyto objektivy stačí úplně pro bakteriologické a obyčejné histologické vyšetřování a téměř se vyrovnají apochromatickému objektivu; pouze při nejjemnějších zkouškách možno při nich dokázati nepatrnou chromasii. Oproti poškození vnějším vlivem jsou mnohem resistantnější než apochromáty a rovněž i mnohem lacinější.

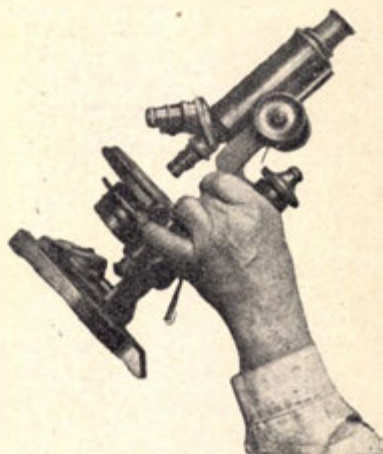
Každý mikroskop musí býti zařízen tak, aby 1. zorné pole bylo co možno nejsvětlejší i při silném zvětšení. 2. Zorné pole musí býti úplně rovné; jak střed, tak i okraj obrazu pozorovaného předmětu musí býti při témže zastavení stejně jasný a ostrý. 3. Zorné pole musí býti úplně bílé, bez barevných okrajů, t. j. čočky musí býti achromatické. U starších, neb špatně stavěných mikroskopů nalézáme obyčejně všechny tři hlavní chyby, které jsme právě uvedli.

Jest nutno s mikroskopem zacházeti velice opatrně; chráníme jej pokud možno nejvíce před prachem, buď tak, že jej ukládáme pod sklenčný zvon, nebo po skončeném vyšetřování do skřínky. Mikroskop nesmíme stavěti na slunné místo, jelikož od zrcadla odražené paprsky objektivem procházející mohly by lehce svým teplem rozpustiti tmel, kterým čočky navzájem jsou spojeny, čímž objektiv stane se nepotřebným. Neopatrným přenášením mikroskopu z místa na místo se velice často a snadno poruší

jemné mikrometrické posunovací zařízení (obr. 27., 28.). Mikroskop při přenášení nesmíme nikdy uchopiti v místech zařízení, jelikož celá váha těžkého podstavce mikroskopu se tak přenáší na jemné závity šroubu posunovacího, který se tím kazí. Pro bezpečné přenášení zhotovují se mikroskopy s držadlem (obr. 17.).



Obr. 27. Správné přenášení drobnohledu.



Obr. 28. Nesprávné nošení drobnohledu.

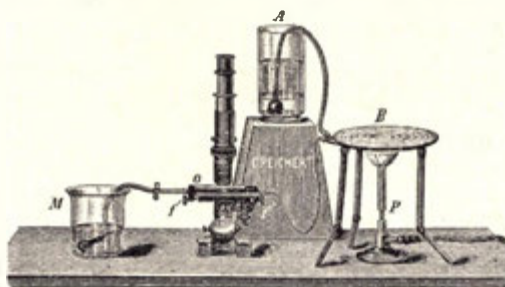
Pomocné přístroje při drobnohledu.

Některá vyšetření mikroskopická mohou se jen za určité teploty prováděti. Předmět, který se má studovati, musí mít po celou dobu vyšetřování stejnou teplotu. Proto byly zařízeny různé přístroje; v první řadě to byl t. zv. vytápěcí stolek podložní. Přístroj ten jest tak zařízen, že na podložní stolek mikroskopu připevní se jiný,



Obr. 29.

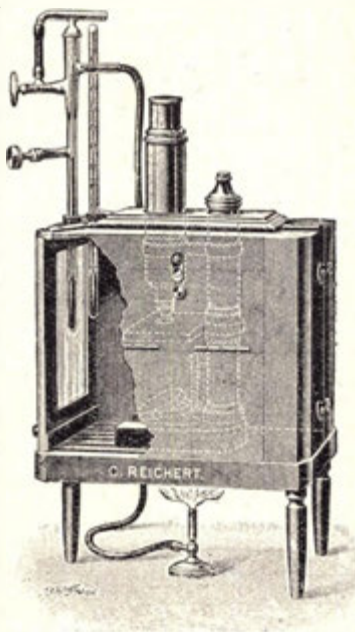
dutý stolek, ve kterém jest umístěna po celé ploše stolku kovová, spirálovitě vedená rourka, jejíž konce přesahují



Obr. 30.

na stranách stolku (obr. 29.). Jeden konec rourky spojí se s rourou gumovou, která se ponoří do nádoby ve výši mikroskopu umístěné, která naplněna jest vodou na určitý stupeň ohřívanou (obr. 30.). Rourkou protékající teplá voda ohřívá stolek, který jest opatřen teploměrem, a vytéká na druhém konci rourky. Přítok a odtok vody dá se jednoduchými svorkami regulovati.

Komplikovanější, naprosto stejnou teplotu chovající jest t. zv. „tepelná skříň mikroskopická“. Je to kovová skříňka o dvojitých stěnách; přední stěna jest skleněná. Mezi stěnami jest voda, která se na dně nádoby plynovým hořákem zahřívá. Skříňka ta je tak upravena, že možno do ní vsunouti celý mikroskop, pouze část tubusu s okulárem a mikrometrický šroub vyčnívá na horní straně skříňky (obr. 31.). V tomto případě zahřívá se celý mikroskop na



Obr. 31.

určitou teplotu, kterou možno na teploměru odečísti. Aby skříňka chovala stále stejnou teplotu, jest hořák opatřen přístrojem k regulování přítoku plynu.

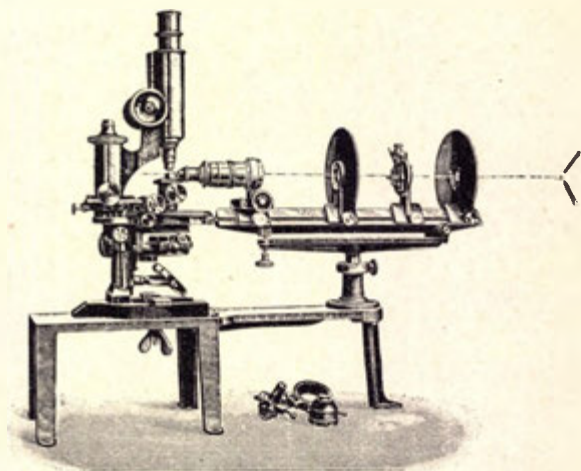
Podobně, jako skříň tepelná, zařízena jest skříň studená, která umožňuje v teplé laboratoři vyšetřování v chladu, pod bodem mrazu až -10°C . Ve skřínce jest uložen mikroskop a mezi dvojími stěnami skříňky uložena jest vrstva ledu, nebo směs salmiaku a ledu. Zařízení tohoto používá se jen ve speciálních případech a nemožno tudíž o něm blíže se zmiňovati. Tepelného zařízení užívá se hlavně v bakteriologii a biologii, studeného zařízení v chemii a botanice.

Ultramikroskop

(dle Siedentopfa a Zsigmondy).

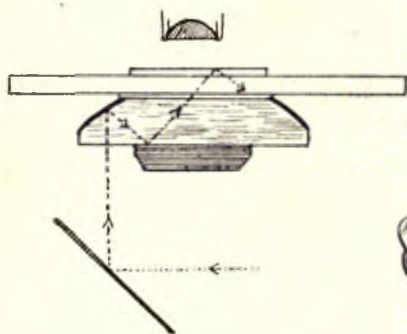
Pod tímto názvem vyrozumíváme určité osvětlovací zařízení k obyčejnému mikroskopu, kterým obdržíme kontrastní osvětlení i těch nejmenších t. zv. ultramikroskopických částic (pod $1\ \mu$). Nejde tudíž o nějaké zlepšení systému čoček, nýbrž o určité osvětlení.

Nejlépe pochopíme princip „ultramikroskopu“, představíme-li si známý jev, který pozorujeme v zatmělé místnosti, do které vniká malým otvorem nebo úzkou štěrbi-

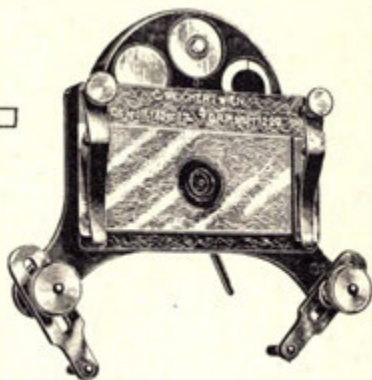


Obr. 32.

nou prudké sluneční světlo. Tu ve světelném pruhu objeví se nesčíslné množství malých částecek plovoucích ve vzduchu, kterých při světle rozptýleném nikdy nepostřehneme. Tyto malé částčky se pozorovateli jeví jako svítící body v pohybu. Právě tak se děje v ultramikroskopu. Pomocí čoček, spojek a silného umělého osvětlení (obloukové lampy) docílují se intenzivního světelného kužele, kterým se osvětluje zkoumaný předmět. V koloidálních roztocích vidíme skutečné deštičky, na př. zlata, plovoucí v tekutině.



Obr. 33.



Obr. 34.

Předmět pozorovaný nejeví se ve svém původním tvaru, nýbrž jen jako svítící bod nebo deštička ve tmavém poli (obr. 32.). Toto zařízení jest velice komplikované a proto velice drahé, takže jest téměř nemožno použití je při běžném vyšetřování, ačkoliv toto pozorování jest velice důležité pro zkoumání biologické, bakteriologické atd. Z těch důvodů sestaven byl na témže principu kontrastního osvětlení jiný přístroj, t. zv.

přístroj k osvětlení v tmavém poli.

Jest zařízení jednak ve tvaru ploténkovém, který možno připevniti na stolec mikroskopu, nebo ve tvaru kondensoru, který se vsune do mikroskopu na místo kondensoru Abbéova. Fa. Reichertova vyrábí t. zv. zrcadlový kondensor, fa. Zeissova kondensor paraboloidový. Pochod světelných paprsků (obr. 33.) v zrcadlovém kondensoru jest znázorněn na přiloženém obrázku. Kondensor sestává

z konvexní čočky, která jest na horní i dolní straně do plochy sbroušena, a ostatní zakřivená část jest kryta stříbrnou vrstvou. Na dolní ploše čočky jest uloženo ploché stínítko, které vyloučí všechny paprsky středem čočky procházející. Paprsek světelný, dopadající na zrcadlovou plochu čočky, se odrazí zpět na její dolní plochu, od této se opět odrazí, dopadá na krycí skélko, kde se lomí a mine úplně objektiv. Poněkud méně šikmo dopadající paprsky na krycí skélko lámou se na částice v preparátu, ohýbají se na těchto a jsou pozorovatelem vnímány.

Jak na přiloženém obrázku (obr. 34.) možno viděti, uložena jest ještě u některých ploténkových přístrojů otáčející se plotna s různými stínítky a jednou konvexní čočkou, kterou možno docíliti okamžité obyčejného osvětlení a možno se při tom přesvědčiti, jde-li skutečně o útvar ultramikroskopický, kterého v obyčejném osvětlení nepostřehneme.

Přístroje k mikroskopickému kreslení.

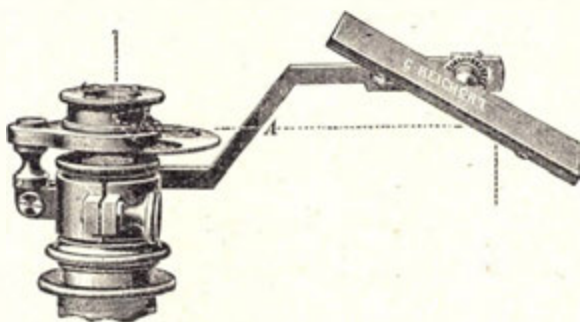
Předem nutno uvéstí, že veškerými t. zv. kreslicími přístroji jest možno jen v hrubých rysech kresliti kontury, buď celých preparátů, nebo při silnějším zvětšení jednotlivých elementů. Vlastní kresba musí se provésti ovšem bez přístroje za ustavičné kontroly preparátu. Přístrojem obdržíme pouze výkres konturový s naprosto správnými zevními formami a vzájemnými polohami i velikostmi jednotlivých útvarů, což jest velikou výhodou proti kreslení z volné ruky, kde jen naevičené oko v odměřování velikosti a vzájemné polohy jednotlivých útvarů může kresby prováděti.

Kreslicí přístroje mají velkou důležitost při vyšetřování, kde nutno prováděti projekce různých útvarů, hlavně při vyšetřování a badání embryologickém, nebo tam, kde zhotovují se modely (na př. dle metody Bornovy, o které se zmiňujeme na příslušném místě).

Veškeré přístroje ke kreslení jsou vlastně „Camera lucida“. Zakládají se na kombinaci prismatických skel, která jsou nad okulárem umístěna, a lámou světelné paprsky z mikroskopu vycházející na kreslicí desku. Nejstarší přístroj je t. zv. komora Oberhäuserova, která skládá se ze dvou v pravém úhlu na sobě stojících ramen. Kratší rameno vsune se na místo okuláru. V ohybu jest

upevněno prisma, jež láme paprsky do jiného prismatu, na konci vodorovného ramene umístěného, které je tak postaveno, že paprsky láme kolmo dolů, čímž povstane na stole vedle mikroskopu reální obraz preparátu. Přístroje toho se nyní málo používá pro velikou ztrátu světla při procházení hranoly. Obraz při silnějším zvětšení vzniklý jest velice slabě osvětlen.

Této vadě světelné bylo úplně odpomoženo nově konstruovaným přístrojem, který dle vynálezce nazývá se „nový kreslicí přístroj Abbeův“. Komora tato sestává z jednoho hranolu, který je tak umístěn, že připevněním přístroje kruhem a svorkami na horní část tubusu nachází



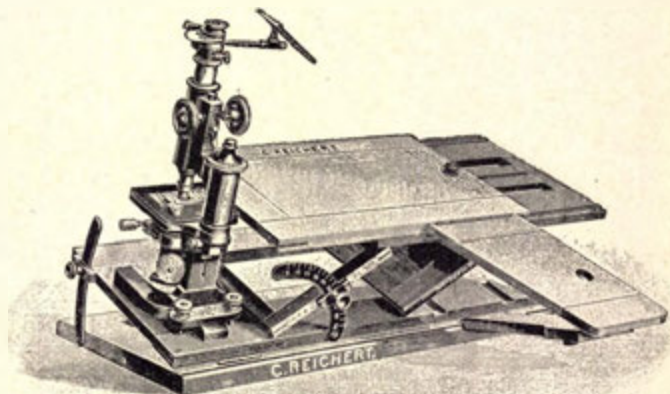
Obr. 35.

se přímo nad okulárem (obr. 35.). Na kruhu připevňovacím jest delší rameno, na jehož konci umístěno jest zrcátko, které možno posunovati. Zrcadlo jest nakloněno pod úhlem 45° proti vidmé ose mikroskopu a pod ním vedle mikroskopu umístěna jest deska, která slouží za podklad, na kterém kreslíme. Kreslíme-li tímto přístrojem, díváme se do okuláru, vidíme desku i s tužkou v zorném poli preparátu, takže možno jednotlivé jeho útvary po jejich konturách obkresliti.

Tímto přístrojem neobdržíme reálního obrazu, jako při komoře Oberhäuserově. Deska, na které kreslíme, nesmí býti položena vodorovně, nýbrž musí býti nakloněna pod úhlem 30° . Sklon desky možno nejlépe zkusmo nalézt tak, že desku stolku nakloníme as v úhlu 30° , na přístroji nakloníme zrcátko tak, aby stupnice u zrcátka ukazovala 0° . Nyní postavíme na nakloněnou plochu stolku tužku nebo pravoúhlý trojúhelník tak, aby stál

kolmo ku ploše stolku, a díváme se do mikroskopu. Je-li deska stolku nakloněna správně, tu objeví se nám na př. u tužky v zorném poli jen její konec; není-li správně nakloněna, vidíme tužku po celé její délce; v tom případě kloníme desku tak dlouho, až se nám objeví pouze konec tužky. Kreslíme-li na desku, která leží vodorovně, obdržíme obraz zkreslený a to tak, že kreslíme-li na př. čtverec, obdržíme obdélník; obraz se směrem od mikroskopu napravo protahuje.

Nakloněný stolek jest možno velice lehce si pořídit. Různé firmy dodávají stolky ke kreslení, které jsou kom-



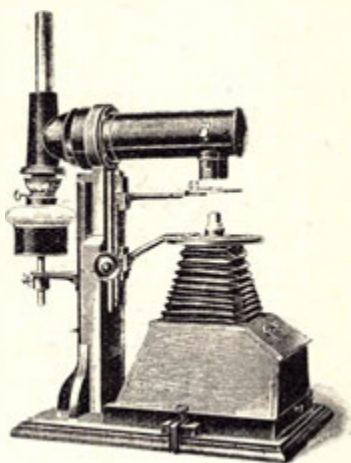
Obr. 36.

plikované (obr. 36.). Desku u tohoto stolku možno dle potřeby různě skloniti a zároveň možno celý mikroskop i s deskou různě nakloniti; na tomto stolku jest kreslení velice pohodlné. Přístrojem A b b é o v ý m můžeme kreslit konturu buď právě tak velikou, jako se jeví v mikroskopu, nebo ji můžeme zmenšiti, po případě i zvětšiti. Hodláme-li kreslit v přirozené velikosti obrazu, totiž tak, jak se jeví pod mikroskopem, nutno stolek tak sestaviti, aby jeho přední hrana byla ve stejné výši se stolem mikroskopu. Máme-li obraz zmenšiti, tu postavíme kreslicí desku výše, než uložen je stolek mikroskopu, máme-li obraz zvětšiti, musí deska býti níže umístěna.

Při projekci mnohdy shledáme, hlavně při slabém zvětšení, že rysovadla není na desce ke kreslení viděti;

v takovém případě nutno světlo v mikroskopu zatemnit, čehož docílíme buď vložením modrého neb hnědého skla, které již jest při komoře Abbéově, nebo tím, že postavíme před zrcadlo mikroskopu skleněnou desku barvy modré nebo hnědé. Nestačí-li ani toto zatemnění, nakloníme poněkud zrcadlo mikroskopu, osvětlující preparát. Kreslení Abbéovou komorou vyžaduje dosti cviku a pevné ruky, máme-li zhotoviti přesné obrazy. — Komorou touto možno přesně změřiti zvětšení, při kterém byla kresba provedena, a to tím způsobem, že po nakreslení preparátu tento s mikroskopu sejme a na místo něho při témže uspořádání díváme se na mikrometr (viz níže!), který vložíme pod objektiv; zvětšené dílky mikrometru projekční komorou přeneseme si na kreslicí desku, kde je zaneseme. Tak můžeme pohodlně a přesně odměřiti zvětšení obrazu. Nakreslíme-li si délku jednoho, neb více dílků, jak se nám pod mikroskopem jeví, a měří-li jeden takový dílek, který na mikrometru odpovídá $\frac{1}{10} mm$, při použití určitého objektivu a okuláru 1 cm, vidíme, že jest skutečné zvětšení jako 0.1 : 10 čili 1 : 100.

Tím způsobem jest možno provésti měření mikroskopických elementů vůbec, nemáme-li po ruce přístroje měřícího.



Obr. 37.

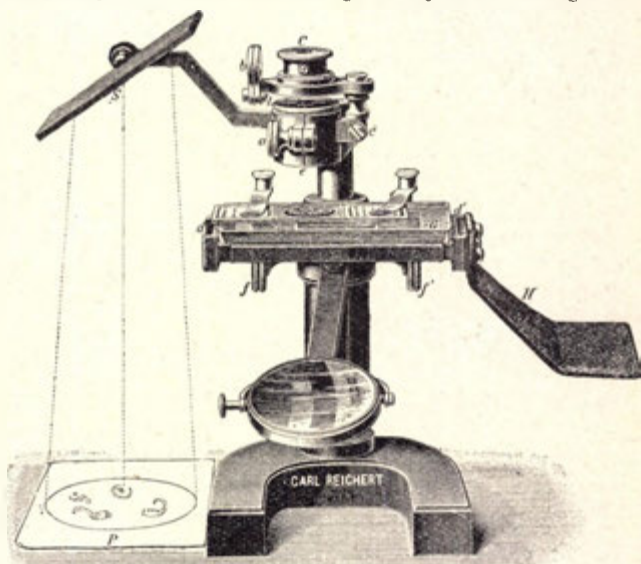
Edingerův přístroj ke kreslení při slabém zvětšení (obr. 37.).

Přístroj tento jest vlastně projekční aparát, kde intenzivní zdroj světla prostupuje preparátem, pod kterým jest umístěna lupa, kterou se promítnutý obraz preparátu zvětšuje a zvětšený obraz dopadá na papír, kde možno kontury obrazu obkresliti. Lupy mají různou délku ohniskovou, čímž se docílí silnějšího neb slabšího zvětšení.

Tento přístroj jest zároveň upraven tak, že pod lupou jest fotografická komora, kde namísto papíru, na němž

se má kresliti, umístěna jest fotografická deska, takže se může obraz fotografovati.

Ačkoliv se zdá zařízení tohoto přístroje dosti pohodlné, má přece jen příliš mnoho vad, než aby mohl býti zvláště doporučen. Odborník v mikrofotografii Dr. Neuhaus sám praví o tomto přístroji, že vedle sferických vad každé lupy má ještě mnoho vad jiných, jako na př. špatnou stabilitu a j. v., takže nemůže přístroj ten k fotografování



Obr. 38.

doporučiti. Co se týče kreslení, tu jest mnohem lepší pomůckou preparační mikroskop se zařízením Abbéova kreslicího přístroje, jde-li o slabá zvětšení (obr. 38.).

Přesné měření mikroskopických elementů.

Na přesné měření pořízeny jsou t. zv. mikrometry, a to mikrometr objektivní a okulární.

Objektivní mikrometr jest sestaven tak, že 1 mm rozdělen jest na 100 dílků, u okulárního jest 1 mm rozdělen na 10 dílků. Máme-li měřiti různé elementy, musíme znáti hodnotu 1 dílku v okulárním mikrometru. Počínáme

si pak následovně: Objektivní mikrometr zastavíme a díváme se naň při určitém zvětšení. Okulární mikrometr, který jest mezi oběma čočkami okuláru, postavíme tak, aby se dílky objektivního mikrometru kryly s dílky mikrometru okulárního. Nyní počítáme, kolik dílků objektivního mikrometru odpovídá 1 dílku v okuláru. Na př. 1 dílek v okuláru rovná se 5 dílkům v objektivu; tu vidíme, že pro určité zvětšení skutečná hodnota 1 dílku okulárního rovná se 0.05 mm ; pro jiné zvětšení vidíme, že 1 dílek horní rovná se 1 dílku dolnímu a tu pravíme, že pro ono zvětšení jest skutečná hodnota dílku okulárního 0.01 mm , je-li objektivní 1 mm dělen na 100. Možno jednou provždy při vlastním mikroskopu sestaviti si tabulku skutečných hodnot 1 dílku okulárního pro různé systémy objektivů dotyčného drobnohledu. Zastavíme-li si nějaký preparát a hodláme-li měřiti na př. délku nějaké buňky při určitém objektivu a nalezneme-li, že délka buňky odpovídá jednomu dílku okulárního mikrometru, tu, známe-li skutečnou hodnotu tohoto jednoho dílku při daném objektivu, vypočteme lehce délku oné buňky.

Pro apochromatické objektivy s kompenzačními okuláry č. 6 jest pořízen mikrometr tím způsobem, že pro každý objektiv odpovídá hodnota jednoho dílku tolika mikronům (0.001 mm), kolik milimetrů čítá vzdálenost ohniska dotyčného objektivu; na př. při objektivu 16 mm rovná se jeden dílek okuláru $16\text{ }\mu$, při obj. $3.0\text{ mm} = 1\text{ dílek } 3\text{ }\mu$ atd.

Různé firmy vyrábějí rozličně sestavené a dosti komplikované přístroje k měření; nejsprávnější metodou zůstane vždy ta, kde pro každý objektiv při různém vytažení tubusu vynajde se hodnota jednoho dílku v okuláru.

Polarisační přístroj.

Zřídka kdy je třeba, aby vyšetření histologické v biologii, zoologii atd. dělo se v polarisovaném světle (vyšetřování v oboru mineralogickém se ovšem bez přístroje takového neobejde), pročež zmiňujeme se jen docela stručně, že k různým stativům dodávají firmy dva druhy polarisačních přístrojů, a to pro stativy malé a velké.

K polarisačnímu přístroji přináležejí jeden polarisátor, jeden analysátor a kolekce sádrových a slídových ploštek, které se různí svým sestavením pro různé mikro-

skopy. Při práci zastavíme pod objektiv analysátor a polarisátor otočíme tak, že při pohledu do okuláru se zorné pole úplně zatemní; potom vložíme preparát na mikroskopický stolek a prohlížíme jej polarisátorem. Tak objeví se nám preparát ve světle polarisovaném (svalstvo, chrupavka, kost atd.).

Známkovací přístroj.

Mnohdy jest nutno, hlavně při velkém zvětšení homogenní immersí, poznačiti si určité místo v preparátě k opětnému nalezení a zastavení téhož. K tomu účelu slouží zvláštní přístroje značkovací. Na obr. 39. jest znázorněn přístroj ve tvaru objektivu, na jehož dolním konci jest umístěn jemný démantový hrot. Hrot *Sp.* jest poněkud excentricky uložen. Deštičkou *Sr.* možno hrot otáčet kolem osy. Vložíme-li tento přístroj na místo čočky (objektivu), kterým jsme určité místo vyhledali, a otočíme-li deštičkou, vyryje hrot démantu, který jest pružným pérem tlačén ke krycímu skélku, na tomto kroužek, čímž místo označeno.



Obr. 39.

Velice jednoduše můžeme si poznačiti určité místo tímto způsobem: Sklopíme mikroskop o 90°, takže hledíme do irisového stínítka v Abbéově kondensoru zespoda umístěného. Zatáhneme-li irisové stínítko až na malý otvor, a pérem, tuší označíme na spodní straně skélka otvor stínítka, po případě objedeme diamantem ku pšání otvůrek ve stínítku a vyryjeme kroužek na skle.

III. Histologické nástroje a tekutiny pro mikroskopická pozorování.

Nástroje pro histologické vyšetřování.

Speciálních nástrojů pro mikroskopické práce jest velice málo. Veškerých nástrojů, kterých se používá při pracích anatomických, použijeme i u prací histologických.

V první řadě jde o různé velké skalpelly, o větší a menší nůžky ohnuté a rovné, dále pincetty hladké a zoubkované. Jsou to vesměs nástroje preparační. Pro řezání z volné ruky používá se rovného, t. zv. Toldtova nože. Stejně řezy možno zhotoviti též obyčejnou břitvou. Chceme-li narychlo zhotoviti řez z čerstvého orgánu, použijeme dvojitého nože Klebsova. Nůž ten skládá se ze dvou paralelně postavených železek, které možno šroubky k sobě přiblížiti, neb oddáliti. Pracujeme-li tímto nožem, tu nutno jej rychle zaseknouti do nějakého orgánu a tažmo projeti; tak zůstane mezi oběma noži vězeti skrojek orgánu, který rozcvřením železek z nože odstraníme a uložíme do fyziologického roztoku. (Nože toho se již neužívá, řezy podobné zhotovují se nyní mrznutím, jak níže uvádíme.)

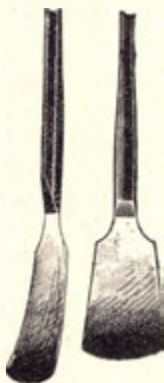
P r e p a r a č n í j e h l y, kterých se v histologii neustále používá, možno si jednoduchým způsobem zhotoviti tak, že obyčejné hrubší jehly k šití zasadíme do dřevěného držátka. Jinak přichází v obchodě velice mnoho různých držadel, do kterých možno jehlu zasaditi a upevniti. Jehel preparačních upotřebíme při trhání (cupování) preparátů, dále přenášíme jehlou řezy do různých tekutin, jako barev, oleje atd.

Do některých tekutin nesmíme ponořiti jehlu kovovou, na př. do kyselin (osmičelé atd.), do roztoku chloridu zlatnatého, do roztoku dusičnanu stříbrnatého atd., poněvadž by se tekutiny oxydačí rychle kazily. V tom případě používáme jehel, které si zhotovíme tím způsobem, že rozžhavíme na plynovém nebo lihovém hořáku skleněnou tyčinku a rychle protáhneme ji do tloušťky, jaké si přejeme. Jehly skleněné jsou velice praktické a levné.

K témuž účelu, upotřebí se též velice často jehel z ostnů ježka, které si vsadíme do dřevěné tyčinky; těchto jehel možno vždy použiti.

Lopatičky neb lžičky histologické.

Tyto lopatičky (obr. 40.) jsou kovové, v různých velikostech a slouží k přenášení řezů z jedné tekutiny do druhé. Ponoříme lopatičku do tekutiny, ve které se řezy nacházejí, jehlou přivedeme řez opatrně na lžičku a při-



Obr. 40.

držíme ho na jejím horním okraji; pak vy-zvedneme lopatičku z tekutiny a nakloně-ním zbývající tekutinu odstraníme. Možno též použiti lopatiček, které jsou dírkované, takže tekutinu nemusíme teprve nahnutím lžičky odstraniti, avšak jemné řezy se snadno poškodí, jelikož jsou odtékající tekutinou vtahovány do otvůrků v lopatce. Řez na lopatce přeneseme do jiné tekutiny nebo barvy. Touto lopatkou přenášíme rovněž zbarvené a olejem prosycené řezy na podložní skélko a to tím způsobem, že položíme přední hranu lžičky na sklo, jehlou pak opatrně řez na skélko stáh-neme.

Skleněné nádoby k mikroskopování.

Velice účelná jsou hodinová sklíčka v různých velikostech, do kterých se ukládají řezy k barvení. Dále jest zapotřebí několik větších skleněných nádobek, t. zv. pta-čích skel, a skleněných misek, které mají zabroušené poklopy a chrání tekutiny před znečištěním od prachu, vyschnutím atd.

Pro mnohé práce jest zapotřebí též větších skleně-ných misek (Petriho), jejichž velikost závisí na druhu práce. Na měření různých tekutin upotřebí se známých graduovaných skleněných válců.

Na odssávání neb přikapování tekutin používá se skleněných kapátek, které mají gumové násadce, t. zv. pipetty. Při filtrování tekutin, barev atd. používá se skleněných nálevek různých velikostí. Rovněž nutno míti v zásobě několik skleněných zkoumavek, kterých velice často upotřebíme.

Tekutiny, barvy atd. uchovávají se v lahvičkách se skleněnou zátkou, které nutno opatřiti správnou signaturou. Veškeré látky, kterých upotřebíme při mikroskopování, musí býti naprosto čisté a nutno pilně hleděti k tomu, aby se prachem neznečistily. Barvy k barvení preparátů jest nutno před použitím vždy filtrovati.

Tekutiny na mikroskopická pozorování.

K mikroskopování nutno míti vždy po ruce některé tekutiny a látky, kterých upotřebíme při vyšetřování čerstvých preparátů. Jsou to t. zv. „tekutiny k pozorování“.

F y s i o l o g i c k ý r o z t o k jest roztok kuchyňské soli 0·8 g na 100 g destilované vody. V tomto roztoku pozorujeme preparáty zhotovené z čerstvého materiálu buď trháním jehlou, nebo řezem. V tomto roztoku prohlížíme rovněž různé natažené průsvitné blanky, jako mesenterium, omentum atd.

K y s e l i n a o c t o v á. Připraví se směs kyseliny octové ledové 1 g na 100 g destilované vody. Přidáním kapky rozředěné kyseliny octové vystoupí v čerstvém preparátě pod mikroskopem velice zřetelně jádra buněčná, vlákna vazivová a j.

G l y c e r i n. V jedné lahvičce glycerin čistý, v jiné směs glycerinu s vodou ve stejných dílech. Této směsi používá se při zkoumání preparátů po utvrzení zhotovených.

To jsou nejdůležitější tekutiny, ve kterých prohlíží se preparát, aniž se trvale uschová. K těmto tekutinám přináleží ještě čerstvá k o m o r o v á v o d a z oka zvířecího, kterou obdržíme rozříznutím rohovky oka volského nebo prasečího. Z přední komory vyteče čirá tekutina, ve které možno vyšetřovati čerstvé preparáty. U m ě l é s e r u m j o d o v é připravíme si takto:

| | |
|---------------|---------|
| Voda dest. | 135 ccm |
| Vaječný bílek | 15 g |
| NaCl | 0·2 g |

Směs filtrujeme a k filtrátu přidáme 3 ccm 10% jodové tinktury. Tím povstane sraženina, kterou nutno znova filtrovati (nejlépe přes předené sklo).

Jodové serum přirozené jest amniová tekutina zvířecího embrya smíšená s jodovou tinkturou; povstane rovněž sraženina, kterou filtrováním odstraníme.

Prosvětlující látky.

Olej origanský nesmí rozpouštět celloidin, ve kterém jsou preparáty zalité. Odbarvuje poněkud barviva dehtová.

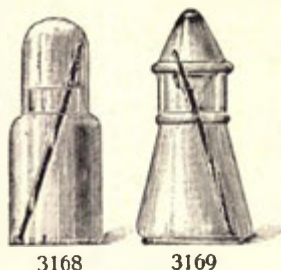
Olej bergamottový nerozpouští celloidin a neodbarvuje preparáty zbarvené dehtovými barvivy.

Olej hřebíčkový rozpouští celloidin, nemožno ho tudíž použít pro řezy celloidinové, leč bychom hodlali celloidin odstraniti. Preparáty, které byly dehtovými barvivy zbarveny, odbarvuje.

Xylol hodí se pro preparáty jak v celloidinu, tak i paraffinu zalité; celloidinové řezy však se silně svrašťují.

Směsi xylolu a anilinového oleje, jakož i xylolu a kyseliny karbolové, používá se jen v určitých případech, na které bude v dalším poukázáno.

Kofler (Z. f. M. Bd. 37, 1920) uzavírá preparáty drog do tekutiny:



| | |
|-------------------|-------|
| Natr. salicylicum | 10 g |
| Aqua destil. | 15 cc |
| Kreos. liquefact. | 5 g |

Tekutina tato má velice mohutnou schopnost prosvětlovací a ponechává veškeré útvary, membrány buněk atd. beze změn.

Obr. 41. Skleněné nádobky na kanadský balsám.

Látky k ukládání preparátů pro trvalé uschování.

Pro trvalé uschování vkládají se řezy většinou do pryskyřice, někdy též do glycerinu, nebo do směsi glycerinu a gelatiny.

1. **Kanadský balsám.** Tohoto balsámu používáme obvykle tak, jak jej v obchodě obdržíme; je-li příliš hustý, rozpustí se přidáním chloroformu, xylolu nebo benzolu (obr. 41.).

2. **Damarská pryskyřice.** Damarskou pryskyřici v prášku rozpustíme v terpentýnovém oleji s při-

dáním benzolu. Roztok tento necháme ustáti několik dní, pak jej sfiltrujeme a filtrát pomalu odpaříme, až dostaneme syropovitou tekutinu.

3. *K o l o p h o n i u m - b e n z o l*. Do benzolu dáme tolik čistého kolophonia, kolik se rozpustí. Pak přidáme ještě trochu benzolu, abychom obdrželi hustou syropovitou tekutinu.

4. *G e l a t i n y* s přidáním několika kapek fenolu používá se v histologii živočišné velice zřídka. Velice často používá se této směsi na preparáty botanické.

Čištění gelatiny.

Gelatina, které hodláme použítí buď k hotovení půd bakteriologických, nebo na uzavírání preparátů atd., musí býti naprosto čistá. Za tím účelem vložíme

10 g gelatiny
do 80 *ccm* destilované vody.

Gelatina ve vodě zduří, pak ji rozpustíme na mírném teple asi při 50—60% C. Připravíme si čerstvý vaječný bílek, ze kterého vezmeme malou lžičku a přidáme 20 *ccm* destilované vody. Tento zředěný bílek přidáme do rozpustěné, ale poněkud vychladlé gelatiny a dobře promícháme. Gelatinu s bílkem nyní vaříme as po 20—30 minut, při čemž se bílek úplně srazí. Když gelatina poněkud zchladla, nutno ji filtračním papírem procediti. Na místo čerstvého bílku vaječného jest možno použítí 0.3 g Albumen ovi siccum.

V glycerinu uložené preparáty, mají-li býti stálé, nutno obehnati rámečkem pryskyřičnaté nebo dehtové látky; nejčastěji se užívá asfaltu, kterým ohradí se krycí skélko, by tekutina nevyschla. (Orámečkování preparátu v glycerinu viz str. 93.)

IV. Vyšetřování za čerstva a fixace.

Vyšetřování za čerstva.

Vyšetřování mikroskopické řídí se povahou dotyčného materiálu a provádí se velice různým způsobem.

Důležité jest vyšetřování „čerstvého“ neb „živého“ materiálu, neboť skutečně jasné představy a názoru o elementech histologických veškerých tkaniv možno nabýti pouze na čerstvém materiálu. Velice lehce lze se přesvědčiti o tom, že chování se plasmatu buněčného, jeho vzhled atd. za živa nemůžeme téměř ani srovnati s útvary, které obdržíme při vyšetřování téhož materiálu po účinku různých tekutin „utvrzovacích“. I jest možno tvrditi, že útvary po různých fixacích jsou jen jakousi „kostrou“ oněch útvarů živých, a každý, kdo vyšetřuje materiál fixovaný, musí míti na mysli, že nemá co činiti s útvary živými, nýbrž jen s jakýmsi „aequivalenty“ oněch útvarů, a najde, že jeden a týž útvar po různých fixacích nabývá různého vzhledu.

Chceme-li vyšetřovati nějakou tkáň za čerstva, jest nutno, abychom ji uložili do prostředí, které by nepůsobilo pokud možno změnu na elementech tkáně. Za tím účelem vkládá se takové tkanivo do „fysiologického roztoku“, nebo jiných, dříve uvedených tekutin (str. 45, 46). V těchto tekutinách můžeme vyšetřovati pouze za čerstva, a nedají se takto získané preparáty na dlouhou dobu uchovati. Má-li preparát býti poněkud déle demonstrován, nutno jej nějakou látkou ve vodě nerozpustnou obehmati, t. j. kolem krycího skélka, na př. parafinem neb hustým ricinovým olejem objeti.

Jest vždy nutno znáti, jakým způsobem možno preparát k čerstvému vyšetřování přizpůsobiti. Chceme-li na př. vyšetřiti částky svalů, tu nemožno takový kousek ihned pod sklíčko vměstnati, nýbrž musí se nejdříve pokud možno na nejmenší makroskopicky viditelné částčky jehlami rozvlákniti. Pochod při této práci jest tento: Na očištěné sklíčko podložní dáme kapku fysiolo-

gického roztoku 0·8% NaCl ; do této kapky vložíme částčku svaloviny a nyní dvěma silnými špičatými jehlami hledíme vlákna od sebe oddělit. Nejdříve roztrhne se kousek na dva díly, a to ve směru vláken, pak pokračujeme v dalším trhání, až povstala tak jemná vláčenka, že není možno jich již dělit. Potom přiložíme očištěné sklíčko krycí opatrně na preparát. Toto přikrytí vyžaduje delšího cviku, neboť proudem tekutiny, který povstává přilnutím skélka krycího k podložnímu, odnášeny jsou nejjemnější, a tudíž nejlepší částčky preparátu ke straně, nebo dokonce, je-li mnoho tekutiny, zcela vyplavou mimo krycí skélko. Podobně si počínáme, hodláme-li vyšetřiti periferní nervstvo. Částku nervu položíme na podložní skélko do roztoku NaCl ; jehlami odstraníme nejprve vazivo (perineurium) na povrchu nervu, potom oddělujeme nervová vlákna, pokud je to možno. V tomto případě musíme si opatrně počínati, a to proto, poněvadž izolovaná nervová vlákna jsou velice jemná a přilnutím krycího sklíčka by se valně poškodila (rozmačkala). Abychom se toho uvarovali, vkládáme mezi sklíčko krycí a podložní úzký proužek hedvábného papíru, nebo úlomek velice tenkého krycího skélka. Tímto podkladem povstává mezi oběma skly dosti velká prostora, ve které se uchrání preparát před rozmačkáním. Takto si počínáme ve všech případech, kde jde o hutnější částčky, poněvíc stejnorodé tkáně, na př. svalstvo příčně pruhované, svalstvo hladké, šlachy, vazivo, různé žlázy, žlázovité orgány atd.

Při vyšetřování tenkých blan, na př. mesenteria, omenta, ligament, atd. vystříhneme kousek blány a vložíme nejdříve tuto částčku do roztoku NaCl v eprouvěť, kde ji po případě volným protřepáním očištíme od různého znečištění, jako krve a p. Poté tekutinu i s preparátem vylejeme na hodinové skélko, nebo jej vyjmeme jehlou z eprouvetty a položíme na podložní skélko do kapky NaCl roztoku. Na jedné straně přichytíme preparát jehlou, a nyní jemnou a čistou vlasovou štětičkou rozvineme jej na ploše skélka. Máme-li preparát rozprostřený, dáme kapku roztoku NaCl na skélko krycí, načež rychle je obrátíme, by kapka přišla na stranu spodní, a preparát jím přikryjeme. Podobným způsobem vyšetřujeme veškeré blány, na př. rohovku, membr. nicticans a vesica urin. u žab, tritona, salamandra atd., kde totiž blána sama jest dosti průhlednou, a kde jednotlivé elementy možno i při

silném zvětšení studovati. Velice poučnou ke studiu za čerstva jest rozprostřená palpebra III. (m. nicticans) žáby.

Při tomto vyšetřování tkaniv za čerstva shledáváme, že jádra buněčná nejsou ve většině případů dosti znatelná; aby zřejmě vystoupila, přidáváme k preparátu rozředěnou (asi 1 %) kyselinu octovou. Děje se to tak, že na preparát, těsně vedle krycího sklíčka, dáme kapku zředěné kyseliny octové, na opačnou stranu preparátu, až ke krycímu skélku, přiložíme proužek ssacího papíru. Tím nastane difuze a tkanivo přijde ve styk s kyselinou. Jest dlužno dbáti toho, aby papírem nebyla vysáta veškerá tekutina, nýbrž jen tolik, kolik nutno, aby preparát nevyschl.

V případech, ve kterých dlužno zbarviti některé útvary preparátů (na př. jádra) nebo provésti určitou reakci na tkáň (jod), nebo reakci na vápno (kyselinami), počínáme si stejně, jako u přidávání kyseliny octové. Na jednu stranu skélka krycího kápneme barvivo dehtové (mnohá z obvyklých barviv by dala ihned sraženinu, jako haematoxylin a j.), na druhou stranu vložíme kousek ssacího papíru. Tímto způsobem možno ovšem zbarviti jen preparáty, které jsou trhané, cupované na malé částčky (svalstvo, šlachy, žlázové útvary); preparáty blanité nebarví se tak dobře. Při těchto postřehneme, že okraje přijímají velice mnoho barviva, střed však zůstává nezbarven. Chceme-li blanité preparáty zbarviti, tu sejmeme krycí skélko s preparátu a vložíme onu blanku do barviva, které jsme si připravili tak, že jednu nebo několik kapek barvy vodové ukápneme do šálečku s roztokem NaCl . V tomto necháme blanku dle potřeby několik minut barviti, pak ji opět v eprouvetě vymyjeme a známým způsobem na podložním sklíčku jehlou a štětkem rozprostřeme.

K podobnému barvení hodí se nejlépe dehtová barviva, a to: anilinová modř, anilinová violet B (S. Mayer) a p. (viz barvy dehtové). Velice krásné a poučné preparáty tímto způsobem zhotovené skýtá vesica urin. žáby, tritona neb salamandra. Rozstříhneme měchýř, část rozprostřeme na skélko a silně štětkem omýváme, abychom blánu zbavili epithelu. Potom protřepeme blánu v eprouvetě, obarvíme v šálku, opět protřepeme a očistíme od nadbytečné barvy, rozprostřeme na podloženém skélku a přikryjeme. Takto získáme preparát, kde jsou velice krásné

zbarveny nejružnější formy buněk vazivových, hladké svalstvo, nervy, cévy atd.

Zvláštního způsobu použijeme při vyšetřování krve — krvenek barevných — za čerstva. Není snad druhého objektu, který by se tak rychle ve své formě měnil, jako rudé krvenky. Není ani možno tak rychle pracovati, abychom za dobu mezi vzetím čerstvé krve (vpich do prstu), přenesením kapky na skélko a přikrytím na skélko podložní, obdrželi nezměněné elementy krve. Nejlépe jest připraviti si vyčištěné skélko krycí tak, že po jedné straně objedeme jeho kraje uzounkým lemem hustého oleje ricinového. Chceme-li pracovati s krví člověčí, jest nejlépe omýti špičku (bříško) prstu a desinfikovanou (opálenou) jehlou vbodnouti do kůže; jakmile se ukáže malá kapka krve, dotkneme se jí čistým a olejem lemovaným skélkem a toto rychle položíme na skélko podložní. Kapka na skélku se roztáhne, není však nijak stlačena, poněvadž skélko odstává následkem vloženého rámečku olejového od skla podložního a olej současně zabraňuje vyschnutí tekutiny krevní. Jen tímto způsobem jest možno po nějakou, ovšem jen krátkou dobu, krev vyšetřovati ve stavu přibližně normálním. Než i tu shledáme, že některá místa ukazují rudé krvenky již pozměněné.

Stejným způsobem nutno vyšetřovati i krev všech jiných obratlovců. U ptáků a studenokrevných obratlovců nastupují změny krvenek poněkud pozvolněji. Nalezneme velice mnoho údajů o různých tekutinách, na př. tekutina Löviho, Periney a j., ve kterých se mají udržeti krvenky rudé nezměněné. Experimentální pathologové hleděli docílití nějaké směsi, která by byla indiferentní a neničila krvenek rudých. Než jako všude, kde nalézáme mnoho prostředků, vidíme, že každý má své vady, tak právě i zde množství jmenovaných tekutin dokazuje nejlépe, že žádná není bez chyb, a že zůstává i nadále tekutina, která by zachovávala krvenky rudé za čerstva beze změn, pouhé *pium desiderium*. Přece však některé z nich zachovávají krvenky po jistou dobu dosti dobře. Nesmí se zapomnouti, co znamená vyšetřování krvenek za čerstva, a hlavně míti na zřeteli, že jde při tom o něco zcela jiného, než při vyšetřování t. zv. moderními methodami, kde krev se suší, konservuje, barví atd., ale to možno jen tam prováděti, kde nejde o skutečné krvenky nezměněné; tato methoda (viz níže) nespadá ovšem do kapitoly této.

Mnohdy jde o to, abychom z určitého orgánu narychlo zhotovili preparát za čerstva, ne však trháním, ani rozprostřením; chceme mít celkový pohled na určitou část orgánu. V tomto případě jest nejlépe, ohnutými nůžkami sestříhnouti pokud možno nejtenší lamelu z orgánu; cvik napomáhá, že možno obdržeti velice tenké plátky, které pak v indiferentní tekutině možno vyšetřovati. Takto připravený preparát bývá zvláště na okrajích někdy tak tenký, že dovolí vyšetření i při silném zvětšení. V případech, kde jde o rychlou diagnosu (při operacích atd.) použijeme dvojitého nože Klebs-Toldtova. Takové řezy stačí úplně pro rychlou diagnostickou orientaci; tak na př. na reakci jodovou pro amyloid, pro diferenciální diagnosu karcinomu, sarkomu atd.

Při vyšetřování za čerstva (živa) při studiu biologickém neb zoologickém počínáme si právě tak, jako při hotovení preparátů jiných. Jde obvyčejně o větší kousky, a tu radno vždy pod krycí skélko něco podložit, na př. úlomek krycího skélka, vlas, nebo proužek hedvábného papíru, by netrpěl preparát tlakem. Někdy možno použití též t. zv. kapky visuté, nebo vlhké komůrky. Na skélko krycí dáme kapku vody k vyšetření a přiložíme na vybroušené skélko podložní. Vyšetřovati možno i při silném zvětšení. Při takovém vyšetřování shledáme tu nepříjemnou vlastnost, že na př. nálevníci vykonávají (zdánlivě) velice rychlý pohyb, a čím silnějšího zvětšení používáme, tím rychleji nám mizejí se zorného pole. Tomu pohybu možno odpomoci bez porušení dotyčného materiálu tím, že na stranu sklíčka krycího kápneme slabý roztok cocainu, nicotinu, nebo silně zředěného chloroformu (chloroform nakapeme do vody v eprouvetě a po delší dobu protřepáváme; nepatrná část chloroformu zůstane ve vodě a stačí k omámení zvířeny v kapce).

Infusoria a pod. můžeme též za živa barviti tak, že na jedné straně skélka nakápneme roztok „Ehrlichovy modře“ neb „neutr. červeně“ v roztoku NaCl , na druhé straně skélka necháme vsakovati tekutinu do ssavého papíru; když je preparát obarven, přidáváme opět čistý roztok NaCl a odsáváme pijavým papírem tak dlouho, až zůstane preparát čistý.

Taktéž barvení určitých elementů za živa jest možno tak provésti, že do kapky roztoku barevného (Ehrlichova modř, neutrální červeně a j.) vkápneme vody vyšetřované,

nebo možno opatrně substanci barvy jehlou na podložní skélko natřít, na to vkápnouti vody, která pozvolna barvu rozpouští a nálevníky (jen některé útvary jich) za čerstva barví (jádra, různá granula a j.).

Týmž způsobem možno dělati preparáty za čerstva z různých kultur bakterií, a tyto vyšetřovati, když jde hlavně o to, zda mají vlastní pohyb, či ne. Jsou to tak zv. *nativní* preparáty.

Fixace preparátů.

Již od prvních počátků badání mikroskopického bylo snahou připravit si čerstvý materiál nějakým způsobem tak, aby bylo možno jej vyšetřiti jinak, než za čerstva. Toho možno dosáhnouti pouze tím, že materiál zpracuje se na tenké řezy. Bylo by však dlužno hleděti k tomu, aby připravený materiál nelišil se ve své podstatě a nebyl pozměněn ve vlastnosti, která mu za normálních poměrů přínáležela. Kam snaha tato vedla, ukazuje nám nejlépe nesčetný počet tekutin t. zv. fixačních, kterých se používá, a které jsou různé vynášeny. Fixační tekutiny jsou různé roztoky a jejich směsi a povstávaly většinou nahodile; není nám známo z literatury, že by některá fixační tekutina byla bývala zavedena ze skutečně vědecky doložených předpokladů.

Že žádná z těchto fixačních method nedocílila toho, po čem histolog touží, ukazují nesčetné modifikace jednotlivých, již od dřívějších dob známých fixací. V poslední době vystoupili mnozí badatelé a předložili si otázku, co jest a v čem vlastně záleží fixace a co děje se v živé tkáni po aplikaci různých fixačních tekutin. Bylo použito různých látek, jako bílku vaječného, liquor folliculi a mnoho jiných, na které se působilo různými fixačními tekutinami, a tu nalezeno při těchto experimentech, že povstávají, na př. ve filtrovaném bílku, nejružnější formace, úplně odpovídající oněm, které nalezneme po fixaci tkáně, a které vykládány jako určité, přeformované struktury v buňkách za živa existující.

Tellyesniczský (Merkel-Bonnet: Jahresberichte XI. 1901) praví: „Histologie přestává býti popisnou vědou, jakmile se popisuje stavba orgánů na základě fixovaných objektů. Různé fixování — se kterýmžto zlem musí histolog počítati — znamená vlastně řadu experimentál-

ních výkonů, které se vsunují mezi živé poměry a popis; avšak první podmínkou každého experimentu jest důkladná znalost veškerých prostředků k vyšetřování potřebných, bez které nikdo se nemá odvážit na pole vyšetřování. A právě, že „fixování“ nestalo se předmětem důkladného studia, musila nastati nutně — následkem neznalosti vyšetřovacích prostředků — taková řada omylů a mylných nálezů. Důležitost fixování jest mnohem větší než barvení; toto jest jen pomůckou snadnějšího vidění již fixovaných částek, aniž by se tím tvar poškodil. Avšak jinak tomu jest při fixování, kde jde o odumření, srážení atd. živé hmoty, čímž povstávají nové sloučeniny bílkovin, a co mnohem důležitější, povstávají pro histologa úplně nové tvary, při jejich posuzování musí býti zachována největší opatrnost.“

Mezi různými pracemi na čistě histologickém podkladě dávají nálezy Flemmingovy velice cenná data. Jsou to ony údaje, které otvírají novou dobu v dějinách fixace, ze kterých povstala jeho, Flemmingova, fixační tekutina. Však zásluha Flemmingova měla již v sobě i zárodky stinné, neboť nenastalo další školou zlepšení věci samé, nýbrž nedostatkem geniálnosti a auto-kritiky mistra právě jen slabá stránka metody vzrostla k velkým omylům. Nenastala čistě kritická pozorování, nýbrž objevila se nesčetná řada tekutin.

Jak již dříve uvedeno, mnoho badatelů obrátilo zřetel svůj k experimentům a zkouškám, jak působí udané a různě vychvalované fixační metody na tkáň, buňky, bílkoviny a p. Jeden z prvních byl prof. Janošík (1893 Česká Akademie), který dělal pokusy s filtrovaným bílkem, se živou bílkovitou látkou, liquor folliculi, s vajíčky ssavčími z ovarií čerstvě vyňatými atd. Pak následovala řada jiných prací: Kaiserling, Görner 1893, Fischer 1894, Tellyesniczský 1898, Vasielevski na botanickém materiálu 1899 a j. v. (Bližší literaturu o těchto a podobných pracích lze nalézt v Merkel-Bonnet, Ergebnisse 1901, XI. sv.)

Velice záslužnou práci vzal na se botanik Fischer, který celou látku fixačních method podrobil přísně vědeckému prozkoušení. Kdo blíže se o věc zajímá, ten musí shlédnouti originální práci, která jest oceněna všemi skutečnými badateli mikroskopické anatomie.

Vyskytly se ovšem i námitky proti jeho práci; tak na př. S. Müller praví: „Dle mého názoru doznaly nálezy Fischerovy ze všech stran plného uznání, ovšem beze vši kritiky; i musím tudíž s Bendou ostře označiti, že veškeré nálezy Fischerovy dosud ani jediný výsledek histologický se světa nepřivodily. Největší snad výtěžek by záležel v tom, aby práce ta vzbudila větší interest pro studium čerstvého materiálu.“

Ovšem taková sofismata nejsou s to, aby tak záslužnou a vědecky odůvodněnou práci oslabila.

Důležité jest, aby si každý histolog uvědomil, že obrazy, které vidíme na fixovaném objektu, jsou více artefakty a jen snad jakousi kostrou toho kterého elementu, a že nemáme před sebou elementy skutečné, nýbrž jen jejich aequivalenty. Struktura plasmatu po fixování neodpovídá struktuře za živa; nedá se tudíž o strukturách buněk fixovaného materiálu mluvit, jelikož jsou vždy závislé na prostředku fixačním, kterého použijeme v tom nebo onom případě. Zároveň vidíme, že jeden a týž fixační prostředek nedělá struktury a sraženiny plasmatu ve stejnorodých buňkách stejně, neboť každá buňka nabude jiného vzhledu.

Veškerá badání o methodách fixačních nepřinesla sice ono kýžené „*pium desiderium*“ histologů, vynalezení universálního fixačního prostředku, avšak veškeré práce shodly se v úsudku, že musíme rozeznávatí látky, které plasma buněčné buď srázejí, nebo nesrázejí, buď rozpouštějí a macerují, a nebo jsou indiferentní, tak na př.: Kalium bichrom. a kyselina osmičelá nesráží vůbec, kyselina octová sráží určité druhy bílkovin, kdežto jiné rozpouští. To jest asi hledisko chemické. Na druhé straně běře se zřetel po stránce fysikální; některé látky svrašťují objekty, jiné opět působí bobtnání. Z pokusů na vajíčkách ssavčích je zřejmo, že na př. sublimátem materiál se svrašťuje, v roz-toku *NaCl* poněkud zbobtná, právě tak jako po Flemmingově tekutině materiál se o něco málo zvětší. Kyselina pikrová se alkoholem úžasně svrašťuje atd. Kaiserling udává, že t. zv. dobrá tekutina fixační jest ona, která konservuje živou tkáň tak, aby byla zachována forma i objem. Při fixačních prostředcích jest nevyhnutelná znalost, jak fixace působí na další pochod při barvení. Tu, jak později ukážeme, po některých fixacích jest možné

zbarvení preparátů různými barvivy, po jiných jen určitými, a konečně některé fixace nedovolují vůbec zbarvení.

Prostředky fixační.

Dle zkušeností nabytých experimentem a mikroskopickým srovnáváním tkaniv, tvrzených různými fixačními tekutinami, rozděluje *Fischer* fixační tekutiny na tři skupiny. Tím ovšem, jak dobře uvádí *Tellyesniczský*, není řečeno, že by snad jedna skupina tekutin byla lepší fixační prostředek než druhá, nýbrž že jedna druhou navzájem podporuje a chyby vyrovnává.

I. skupinu tvoří kombinace směsi osmičelé kyseliny s kyselinou octovou. Tyto dávají ostré obrazy buněk, leč vyžadují jen malých objektů.

II. skupinu tvoří kombinace směsí dvojhromanů s kyselinou octovou. Tyto tekutiny dovolují zbarvení různými methodami a hodí se zároveň pro všeobecnější používání. Dovolují fixování velkých objektů. Nutno pamatovati, že tkaniva se chromany zabarvují.

III. skupinu tvoří tekutiny, kde opět jen kyselinou octovou obdržíme fixaci, aniž se elementy zabarvují. Řezy možno barvití nejrozličnějšími methodami. Sem náleží sublimát, formol, alkohol a chloridy různých těžkých kovů.

Kyselina osmičelá 0·5—1% rozpuštěná ve vodě, do níž ukládají se preparáty, které smějí býti jen velice malé (několik milimetrů). Této tekutiny používá se ponejvíce jako reagens na tkáň tukovou, myelín a pod. Jelikož nesráží protoplasma, jest nutno, chceme-li preparát ještě barvití, vložiti kousky materiálu po vymytí dodatečně do Müllerovy tekutiny.

Kyselina osmičelá doporučuje se k fixování ve způsobě par. 2% roztok kyseliny dá se do lahvičky se širokým hrdlem, malé kousky materiálu upevní se buď na zátku, neb se zavěsí do lahvičky tak, aby nebyly ve styku s tekutinou.

Kyselina osmičelá s kyselinou octovou:

Kyselina osmičelá 1% 4 ccm

Kyselina octová 1% 100 ccm.

Po utvrzení dobře vymývati v alkoholu!

Chrom — osmium — oacet. Flemmingova tekutina; tato směs jest ve dvou koncentracích, a to: slabá a silná.

| | | |
|-------------|----------------------|----------------|
| Slabá směs: | kyselina chromová 1% | . 25 ccm |
| | „ osmičelá 1% | . . 10 ccm |
| | „ octová 1% | . . . 10 ccm |
| | destilovaná voda | 55 ccm |
| Silná směs: | kyselina chromová 1% | . 75 ccm |
| | „ osmičelá 2% | . . 20 ccm |
| | „ octová ledová | . . 5 ccm. |

Fixování materiálu touto tekutinou jest velice obtížné, máme-li obdržeti skutečně celý preparát touto tekutinou „prefixovaný“. Nutno podotknouti, že v této tekutině máme tři substance, které nestejně rychle materiál prostupují; nejrychleji vniká kyselina octová, pak chromová a nejpозději kyselina osmičelá. Proto jest dlužno do této tekutiny ukládati velice tenké kousky materiálu — nezáleží tak na rozloze do šířky, jako na tloušťce preparátu; nutno jej tak upravit, aby celý objekt mohl býti všemi třemi substancemi co možná nejrychleji stejnoměrně prostoupen. Zda jest preparát řádně fixován, poznáme dle řezu naloženého objektu. Při větším a tlustším kousku jest kraj zbarven do hněda, dále od kraje jest řezná plocha objektu žlutá a ve středu již pouze bílá. V takovém případě byla fixace nesprávná, neboť pouze na kraji bylo fixováno správně, dále ke středu působila již jen kyselina chromová s octovou, ve středu pouze octová. Při mikroskopickém vyšetřování řezů, zhotovených z takto utvrzeného materiálu, vidíme ovšem veliký rozdíl na stejnorodých elementech.

Flemming tvrdí, že stačí již krátká doba, asi 6 hodin, aby materiál byl dobře fixován, avšak zkušenost ukázala, že preparátu neškodí, ponecháme-li jej v tekutině po 24 hod. i déle, jelikož fixace je tím jistější. Zkušenost a pokusy učí, že jest vždy lépe ponechat materiál déle ve fixační tekutině, neboť jednou fixovaným elementům tekutina již neškodí. Jest nutno tudíž do Flemmingovy tekutiny ukládati tenké úřezky orgánu, kde je ponecháme 6—24 hodin i déle, dle jich rozlohy. Fixovaný materiál vymyjeme důkladně v tekoucí vodě (as 24—48 hodin), a uložíme jej nejprve do slabého lihu, který pozvolna zesilujeme, až na 96%.

Má-li se docílit dobrých výsledků barvení, doporučuje se materiál rychle zpracovati. Barví se dobře haematoxylinem, safraninem, gentianou a j. v. Buňky tukové

a myelin nervových vláken jsou po kyselině osmičelé zbarveny černě. (Srovnej barvení nervstva str. 147.)

Z e n k e r o v a tekutina: Aq. dest. 100 ccm

| | | |
|----|-------------------|-------|
| a) | { sublimat | 5 g |
| | { kalibichrom. | 2·5 g |
| | { natr. sulfur. | 1 g |
| b) | acid. acet. glac. | 5 ccm |

Kyselinu octovou přidáme v udaném poměru v poslední chvíli, když hodláme tekutiny upotřebiti. Pro menší kousky nebo malá embrya stačí tvrzení 2—10 hodin, u větších kousků orgánů 24 hodiny i déle; celé orgány, jako jazyk, ledvinu, mozek atd. tvrdíme 48 hodin a i déle.

Po tvrzení nutno objekt dobře vymýti v tekoucí vodě (po 2—6 hodin). Potom vložíme jej do 50% lihu, který několikrát obnovíme, až se přestane chromem zbarvovati; alkohol se zesiluje až na 96%. V preparátu zůstávají sraženiny sublimátu, které odstraníme přidáním jodové tinktury do silného lihu, která zbarví jej slabě žlutě. Po nějaké době se líh odbarví. Přidáváme jodovou tinkturu tak dlouho, pokud alkohol se odbarvuje, totiž pokud jod v alkoholu jest sublimátem redukován. Tato fixační tekutina jest uznána za velmi dobrou k tvrzení jednotlivých elementů a k úspěšnému barvení.

M a x i m o v doporučuje místo kyselé **Z e n k e r o v y** tekutiny tuto směs:

| | |
|------------------|----------|
| Vody destill. | 1000 ccm |
| Sublimatu | 50 g |
| Dvojchrom. dras. | 25 g |
| Glauberovy soli | 10 g. |

Před upotřebením přidává se na 100 ccm směsi 10 ccm formolu. Do tekutiny vkládá se úplně čerstvý, teplý materiál. Tekutinu tuto doporučuje hlavně pro embryologický materiál k cytologickým studiím. Malá embrya do 3 mm nechá v roztoku 1 hodinu, větší na nejdéle 6 hodin. Po fixování vypírá 24—48 hodin v tekoucí vodě.

M a x i m o v - Z e n k e r, formol-osmium.

Ke shora uvedené tekutině přidává před upotřebením na 100 ccm základní tekutiny 10 ccm formolu a 10 ccm 2% kyseliny osmičelé. Materiál vložený do této tekutiny nechá fixovati ve tmě po 24 hodiny i déle. Kyselina osmičelá prostupuje dle něho velice dobře do hloubky, a i nej-

menší kapénky tuku intensivně černají. Redukovaný, černě zbarvený tuk vzdoruje odbarvovacímu vlivu etherických olejů a pryskyřic.

Zenkrova tekutina jest jen modifikací fixační tekutiny t. zv. Müllerovy, která byla jednou z prvních tekutin, určených v histologii hlavně na tvrzení elementů centrálního nervstva, a které se také dodnes v tomto směru používá.

Müllerova tekutina:

| | |
|-------------------|-------|
| Kalium bichromat. | 2·5 g |
| natrium sulfat. | 1 g |
| aqua dest. | 100. |

Vložené orgány nutno po delší dobu v tekutině ponechati; tekutina se po nějaké době kalí a je dlužno ji tak dlouho vyměňovati, pokud nezůstane čistou (mozek lidský po několik měsíců). Poté orgán důkladně vypeřeme ve vodě a uložíme do slabého lihu, který vyměňováním stupňujeme až do 96%.

Erlického tekutina jest opět jiná modifikace předešlé:

| | |
|-----------------|----------|
| Kal. bichromati | 2·5 g |
| cupri sulf. | 1 g |
| aq. dest. | 100 ccm. |

Postup jako u Müllerovy tekutiny.

Tekutina Kultschizkyho (Z. f. w. M. IV. Bd. 1887) jest nasycený roztok dvojehromanu draselnatého a skalice modré v 50% lihu. Před použitím přidá se na 100 g této tekutiny 5 kapek kyseliny octové. Tekutinu, jakož i v ní uložený materiál nutno chovati v temnu. Objekty ponechají se v tekutině 12—24 hodin, načež se přenesou na 12—24 hod. do silného lihu.

Tekutina II. (Arch. f. w. Mikr. 897): dva díly dvojehromanu dras., $\frac{1}{4}$ dílu sublimátu, 50 dílů 2% kys. octové a 50 dílů alkoholu 96%. Směs tuto nutno po 24 hodinách zfiltrovati.

Materiál ponechá se v tekutině 4—6 dnů.

Chromová kyselina samotná ve slabých vodních roztocích 0·1—1% bývá zřídka používána. Vyžaduje velice malých preparátů, těžko prostupuje, a materiál v ní fixovaný stává se křehkým a barvení jest velice obtížné.

Kys. chromová a kys. mravenčí (dle Rabla):

| | |
|---------------------|----------|
| Acid. chromic 3% | 200 ccm |
| Acid. formic. conc. | 5 kapek. |

Vždy jest nutno připravití čerstvou tekutinu a jen malé kousky fixovati. Po fixaci je důkladně propereme vodou, tvrdíme ve vzestupně silném alkoholu. Rezy barvíme haematoxylinem nebo safraninem.

Kyselina chromová a kys. octová (dle Flemminga):

| | |
|-----------------|---------|
| Acid. chrom. 1% | 70 ccm |
| ac. acet. glac. | 5 ccm |
| aqua dest. | 90 ccm. |

Hodí se na rostlinné a zvířecí orgány, které možno barviti haematoxylinem nebo borax-karminem. Preparáty nutno dlouho vymývatí vodou (24 hod.) a tvrditi ve vzestupně silném alkoholu až do 96%.

Fixační tekutiny, v nichž hlavní součástí jest sublimát:

Rabl-ova tekutina. Rabl udává dvě tekutiny tohoto složení:

- 1 díl nasyceného vodného roztoku sublimátu
- 1 díl nasyceného vodného roztoku kyseliny pikrové
- 2 díly destilované vody.

Lepších výsledků docílil druhou tekutinou:

| | |
|------------------------|---------|
| Chlorid platnatý | 1 díl |
| sublimát konc. ve vodě | 1 „ |
| voda | 2 díly. |

Tato fixační tekutina hodí se hlavně pro materiál embryologický. Po fixaci, která trvá několik hodin (24 i déle), ukládá se materiál do alkoholu vzestupně od 50% až do 96%. Barviti možno různě. Rabl sám barví hlavně košenilou dle Czokora nebo Delafieldským haematoxylinem.

Sublimát: Koncentrovaný roztok ve vodě (asi 7 g na 100 ccm vody).

Sublimát octet (dle Langa):

| | |
|---------------|----------|
| Sublimát | 3—12 ccm |
| chlornatrium | 6—10 g |
| alumen crud. | 0.5 g |
| acid. acetic. | 50 ccm |
| aqua dest. | 100 ccm. |

Materiál dlužno fixovati asi $\frac{1}{2}$ hod., nato přenést do 70% lihu a vzestupně až do 96%! Dosti pěkné fixování dává nám směs:

| | |
|-------------------------------|---------|
| Sublimát conc. roztok ve vodě | 50 ccm |
| alkohol 96% | 50 ccm |
| aqua dest. | 100 ccm |
| acid. acet. glac. | 5 ccm. |

Fixovati 2 hod. až 2 dny, přenést do alkoholu 70% a vzestupně do 96%. Barviti možno různými barvivy.

Odstranění sraženin po fixaci sublimátem.

Materiál, který byl fixován v sublimátě nebo v tekutinách, ke kterým se sublimát přidává, vykazuje skoro vždy v řezech černé sraženiny, které nutno odstraniti. Za tím účelem vkládáme materiál do alkoholu, ke kterému přidáme několik kapek jod-jodkalia. Je-li v materiálu mnoho sraženin, tu odbarví se alkohol velice brzo a nutno opět trochu jodu k alkoholu přidati. To dlužno tak dlouho opakovati, až zůstane alkohol po delší dobu zbarven.

Tímž způsobem si počínáme, nalezneme-li sublimátové sraženiny v řezech; vložíme řezy do alkohol-jod-jodkalia na několik minut až se všechny sraženiny rozpustí, a jod z řezů, které jsou žlutě zbarveny, v čistém alkoholu odstraníme.

Helly - Maximova tekutina:

| | |
|-----------------|-------|
| Sublimát | 5.0 g |
| Kal. bichrom. | 2.5 g |
| Natr. sulfuric. | 1.0 g |
| Aqua destill. | 100 g |

před upotřebením se přidá $\frac{1}{10}$ objemu formolu. Fixovat dlužno as 2 mm tlusté kousky, mýti po 24 hodin v tekoucí vodě, přenést do 70% postupně do 96% alkoholu.

Hermannova tekutina:

| | |
|---------------------|--------|
| chlorid platnatý 1% | 15 ccm |
| kys. osmičelá 2% | 4 ccm |
| kys. octová ledová | 1 ccm. |

Fixuje podobně, jako tekutina Flemmingova. Preparáty do slabého alkoholu přenést a stupňovati až na 96%. Možno použití různých barviv, hlavně safraninu a gentiany.

Kyselina dusičná v různých koncentracích používá se rovněž jako fixační tekutina.

Nejčastěji udává se kys. dusičná 3% ve vodě, aby-
chom fixovali malé kousky, které přeneseme po $\frac{1}{2}$ až 6
hodinách do alkoholu 50% a vzestupně až do 96%.

Flemming udává pro malé embryologické preparáty:
40% kys. dusičnou na několik minut.

P e r e n y o v a t e k u t i n a :

| | |
|----------------------|---------|
| kyselina dusičná 10% | 40 dílů |
| alkohol absol. | 30 „ |
| chromová kys. 0.5% | 30 „ . |

K fixaci malých objektů stačí 5 minut, ke tvrzení
4—5 hodin. Preparát dlužno vložit po fixaci do alkoholu
70%, který se několikrát vymění, a potom přenést do
silnější koncentrace vzestupně až 96%. Možno barvit
libovolně.

A l k o h o l. Tohoto prostředku používá se nejvíce
tam, kde jde o rychlou orientaci. Různé koncentrace (mezi
60—95%) uvádějí se jako fixační prostředek. Fixujeme
tím způsobem, že orgán v malých kouscích ukládáme do
lahvičky s lihem. Na dno lahvičky vložíme malý kousek
vaty, a to z té příčiny, aby voda z preparátu lihem extra-
hovaná klesla ke dnu a preparát, který spočívá na vatě,
nepřišel již s ní do styku. Preparát možno též zavěsiti
na niti do středu láhve. Počneme-li s lihem 60%, musíme
jej často obnoviti a zesilovati, takže asi ve 24 hodinách
dostoupneme na lih 96%, v němž možno preparát pone-
chat, jak dlouho chceme. Ukládati preparáty ihned do
lihu 96% se nedoporučuje, poněvadž materiál se příliš
svrašťuje. Na preparáty fixované alkoholem možno použít
nejrůznějších barev; všechna jeví dobrou affinitu k jed-
notlivým elementům.

A l k o h o l — k y s e l i n a o c t o v á :

| | |
|--------------------|---------|
| Alkohol 96% | 300 ccm |
| kys. octová ledová | 100 g. |

Směs fixuje velice rychle. Po fixování nesmíme vy-
mývat kyselinu vodou, nýbrž vložíme preparát ihned do
čistého lihu, který několikrát vyměníme. Barviti možno
různě.

F o r m o l. V poslední době vyskytla se velká řada
fixačních a zároveň tvrdících tekutin, jichž hlavní součást

tvoří formol. Formol, jak v obchodě se prodává, jest 40% formaldehyd (aldehyd kys. mravenčí). Formol sám, jak dokázáno, nesráží bílkovin; srážení bílkovin působí kyselina mravenčí, která se ve formolu vždy nalézá. K fixování užijeme formolu, jak jej v obchodě obdržíme, ve 4%—10% zředění ve vodě; v tomto roztoku materiál poněkud bobtná. Preparáty možno ve formolu ponechat delší dobu, aniž prý ztrácí na schopnosti barvení, avšak nutno bráti zřetel k tomu, že chová různé množství kyseliny mravenčí, která má vliv na různé tkáně a zároveň odvádí. Materiál z formolu, aniž jej vymýváme ve vodě, přenášíme do 70% alkoholu a vzestupně zesilujeme až do 96%. Barvení dovoluje libovolné.

Velice dobrou vlastností formolu jest, že možno po fixování přenést preparáty později do různých jiných tekutin, jako na př. do Müllerovy, do sublimátu atd. Činíme tak proto, aby mnohé látky (bílkoviny), které nejsou dosud formolem sraženy, byly ještě dodatečně fixovány. S velkým úspěchem používá se formolu v centrálním i periferním nervstvu. Materiál fixujeme nejdříve formolem a potom jej impregnujeme solemi různých kovů. (Viz stati speciálních method.)

O d s t r a n ě n í s r a ž e n í n p o f i x a c i f o r m o l e m .

Po fixaci formolem nalezneme velice často, hlavně ve tkáních krevních orgánů, temné sraženiny, které nutno odstraniti.

V e r o c a y udává tuto methodu: Řezy vloží se as na 10 minut do louhu tohoto složení:

| | |
|----------------------------------|----------|
| 1% vodní roztok louhu draselného | 1 díl |
| 80% alkohol | 100 dílů |

potom vypírají se 5 minut v destil. vodě, kterou nejméně dvakrát vyměníme. Pak řezy vložíme opět do 80% alkoholu a nato je přeneseme do vody. Hodláme-li v materiálu barviti mikroorganismy, pak nemožno použití této metody, poněvadž luh působí na mnohé tkáně velice škodlivě.

O r t h o v a t e k u t i n a :

| | |
|--------------------|---------|
| Formolu | 10 dílů |
| Müllerovy tekutiny | 90 „ |

doporučuje se hlavně pro rychlé tvrzení a fixování centrálního nervstva.

Nutno upozorniti, že není radno ponechat materiál po dlouhou dobu v této směsi — jak tomu jest u tekutiny Müllerovy — neboť materiál ve formolu a Müllerově tekutině uložený stává se po delším čase příliš tvrdým a naprosto neschopným k řezání.

V literatuře nalezneme údaje, kde formol jest smíšený se všemi možnými složkami, jako: *formol s kys. pikrovou* v různých koncentracích, formol s chloridem zinečnatým, formol se skalicí modrou, formol s chloridem platnatým, formol se sublimátem atd. Možno říci, že každý pracovník připraví si a vyhledá směs takovou, jaká se mu nejlépe osvědčí, srovnává-li výsledek se tkání normální.

Kyselina pikrová. Pikrová kyselina, má-li fixovati, musí se použiti v koncentrovaném vodním roztoku. Preparáty se nesmí vyprati ve vodě, nýbrž vloží se ihned do alkoholu 70% a vzestupně se připraví do 96%.

Roztoku alkoholického používá se velmi zřídka. Dosti často užívá se kyseliny pikrové v těchto směsích:

Bonezi:

| | |
|---------------------------|--------------------|
| konc. roztok kys. pikrové | 100 dílů (ve vodě) |
| vody | 100 „ |
| kys. octové | 3 díly. |

Rawitz:

| | |
|------------------|---------|
| kyselina pikrová | 1 díl |
| „ dusičná | 1 „ |
| „ chromová 1% | 4 díly. |

Kleineberg: Kyselina pikrová-sírová.

100 dílů nasycené kys. pikrové, 2 díly kys. sírové; směs nutno filtrovati a rozřediti trojnásobným množstvím destil. vody.

Mayer přidává ke 3 dílům kys. sírové ve 100 dílech vody kyselinu pikrovou, až jest roztok nasycený.

Preparáty takto fixované (po 3 i více hodinách) nutno uložití přímo do 70% líhu, který zesilujeme až na 96%. Dlužno fixovati po 24 hodin a přenéstí ihned do alkoholu.

R a t h :

| | |
|----------------------------------|----------|
| kysel. pikrová koncentr. ve vodě | 100 dílů |
| „ osmičelá 2% | 6 „ |
| „ octová ledová | 1 díl. |

Malé kousky materiálu dlužno fixovati jen $\frac{1}{4}$ až 1 hodinu, větší 24—28 hodin, načež se přenesou do alkoholu 70%; barví se nejlépe safraninem v 30% lihu neb borax-karmínem v celku. Možno též barviti haematoxylinem. Kyselina pikrová dlouho barví alkohol a odstraní se pouhým vypíráním velice nesnadno. Chceme-li žlutou barvu z preparátu odstraniti, tu docílíme toho velice rychle přidáním lithii carbonic. do lihu a to tím způsobem, že koncentrovaný vodní roztok lithia kapeme do alkoholu.

Při fixování nutno po většině dáti hojnost fixační tekutiny. U některých tekutin stačí jen tolik, aby preparát byl ponořen; tak tomu jest hlavně u tekutin rychle pronikajících, a u Flemmingovy tekutiny. Kyseliny pikrové jest nutno používatí velké množství; tu hledíme, aby kyselina pikrová v krystalech ležela na dně nádoby, aby se tak roztok mohl ustavičně zesilovati.

Dlužno fixovati materiál pokud možno nejčerstvější, totiž živý, a snažíme se, aby tekutina fixační pronikla celý materiál pokud možno nejrychleji. Proto fixují se malé a tenké kousky, aby materiál uvnitř nepodlehli hnilobnému rozkladu dříve, než fixační tekutina by jej pronikla. Pozorujeme velice často (nejčastěji po fixaci v tekutinách s chromovými solemi), že stejnorodé elementy při mikroskopickém vyšetřování udávají nám ve středních částech jiný obraz, než na periferii. Je to podmíněno právě hnilobným pochodem, který vznikl dříve, než fixační tekutina mohla proniknouti celým kouskem materiálu.

Jak dlouho dlužno preparát ponechatí ve fixační tekutině, není možno přesně udati; závisí to vždy na velikosti a tloušťce materiálu, který fixujeme, a na rychlosti, s jakou fixační tekutina materiál proniká.

Ve většině případů jest nutno přebytek fixační tekutiny z preparátu odstraniti vodou; tak tomu jest hlavně u tekutin chromových solí a některých solí těžkých kovů. Mnohdy obdržíme špatné nebo žádné zbarvení jen proto, že v preparátu zbylo mnoho fixační látky. Jindy nevytváří se fixační tekutina vodou, nýbrž alkoholem, neb

jinou tekutinou, což je vždy blíže udáno u dotyčného předpisu.

Hofker J. (Trichlor-octová kyselina jako fixační prostředek.) Autor doporučuje různé směsi kys. trichl. octové. Protozoa, Polychaety, Cestody, Echinodermata a jich larvy, Tunicaty a Crustacee fixuje ve směsi

5%ní vodní roztok kys. trichloroctové
5%ní kys. octovou led. ãã part. aeq.

Drobné larvy ponechá v tekutině půl hodiny a přenesení je na čtvrt hod. do 35%ního alkoholu, pak do 50%, 70%, 96% a do absolutního alkoholu. Nato vloží materiál do xylolu, až se stane úplně průhledným a přenesení jej do xylol-paraffinu, kde zůstane as 20 minut, načež nassaje pipetou materiál a vloží do čistého paraffinu při 60° C. Po 20 minutách možno zalíti.

Pro hmyz, kde jak známo chitin v kyselém roztoku velice bobtná, používá těchto roztoků:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| I. Pikrová kyselina 1% v absol. lihu | 1 díl, |
| Chloroform | 1 „ |
| Formol | 1 „ |
| Trichloroctová kys. | 1 „ |
| II. Kyseliny octové led. | 1 díl |
| Trichl. octové | 1 „ |
| Absol. lihu | 8 dílů |
| III. Trichloroctové kys. | 1 díl |
| Alkohol absol. | 9 dílů. |

Použije-li se bezvodé fixační tekutiny, možno materiál přenéstí přímo do absol. alkoholu a pak do benzolu.

Pro obratlovce shledal nejlepší tekutinou roztok:

| | |
|------------------|---------|
| Kys. octové led. | 1 díl |
| Trichloroct. | 1 „ |
| Alkohol abs. | 8 dílů. |

Pěkných výsledků docílil při konservaci žlázových orgánů, jater po zbarvení haematoxylin-eosinem; varlata zachovávají elementy velice pěkné a zároveň se v paraffinu nechají řezati serie 3—5 μ . Pro Cortiho orgán doporučuje tuto metodu konservace; po utvrzení v alkoholickém roztoku (po 24 hodin) odvádňuje ve vodním 5% roztoku kys. trichloroctové as jeden den.

(Metoda tato, právě tak jako jiné, má své zastánce, ale též velkou řadu odpůrců.)

Tvrzení preparátů. V některých případech materiál uložený do fixační tekutiny zároveň se utvrdil, v jiných případech zůstávají preparáty měkké a nutno je teprve utvrditi. Tvrzení preparátů jest nutné, aby netrpěly při zalévání, řezání, montování atd. Preparáty, které jsou fixovány a zároveň utvrzeny (Flemmingova tekutina, většina směsí s chromovými solemi, formol, alkohol), ukládáme do alkoholu nejen proto, aby se ještě více utvrdily, nýbrž hlavně proto, abychom je odvodnili.

Uchování makroskopických preparátů v přirozených barvách dle Kaiserlinga.

Čerstvý materiál vloží se do směsi:

| | |
|-----------------|--------|
| Formalinu | 200 cc |
| Vody | 1000 |
| Kalium aceticum | 15 gr |
| Kalium nitricum | 30 gr |

v tekutině ponechá se preparát 12—24 hodin i déle, dle velikosti, načež se vloží do 96% lihu na tak dlouho, až objeví se původní barva krve. Preparát uchová se ve směsi:

| | |
|------------|---------|
| Vody | 2000 cc |
| Kal. acet. | 200 gr |
| Glycerinu | 400 cc. |

Zachová se hlavně barva krve, jiná barva ztrácí i v této tekutině původní zabarvení.

Chitin.

Při vyšetřování hmyzu klade největší obtíže při řezání chitin. Jest udávána velká řada různých tekutin, které mají umožniti řezání chitinu, ale žádná nedává dobrých výsledků.

Eau de Javelle měkkí sice chitin, ale tkáň pod chitinem za dobu působení této tekutiny jsou téměř zničeny. **Tekutina Perenyova** (chrom, alkohol, sublimát a kyselina dusičná) nezměkčí chitin, ale naduří nápadně tkáň. Pokud sám jsem se

mohl přesvědčiti (seriové řezy mouchy, atd.), osvědčuje se nejlépe směs dle Henningse (Ztschft. f. w. M. XVII.), který sám zkoušel veškeré udávané metody s naprostým neúspěchem, a který sám sestavil vlastní tekutinu, o které praví, že měkčí chitin a současně dobře konservuje tkáň.

Směs připravuje takto:

kyseliny dusičné 16 dílů,
 kyseliny chromové 16 dílů,
 konc. roztok sublimátu v 60% alkoholu 24 dílů,
 vodný roztok kyseliny pikrové 12 dílů,
 absol. alkoholu 42 dílů.

Materiál konservuje dle velikosti objektu 12—24 hodin, potom vypírá jej v 60% alkoholu s přidáním jodu, přenáší jej do vzestupně silného alkoholu, pak do xylolu a paraffinu. Docílil řezů tloušťky 4 až 2 μ . Řezy, i seriové, lepil na sklíčka natřená mastix-kollodiem, avšak možno též použití bílku.

Neudávám jiných method, jelikož se této, kterou považuji z vlastní zkušenosti za nejlepší, nikterak nevyrovnají.

V. Odvápnění, macerování, bílení, zažívání.

Hotovení výbrusů.

Methody odvápňovací.

Při vyšetřování orgánů prostoupených vápennými solemi (na př. kosti), dále při vyšetřování pathologickými pochody různě zvápenatělých orgánů, cev a p., naskýtá se velká obtíž v odstranění těchto anorganických látek, aniž by se přitom poškodila struktura tkání, ve kterých jsou soli nahromaděny. Z veliké řady pokusů jest vidno, že nemáme v histologii spolehlivé tekutiny, která by všem požadavkům vyhovovala. Některé kyseliny, kterých se k odvápnění používá, působí zhoubně na tkáň, v jedněch tkáně velice zduřují, v jiných se opět svrašťují. Po některých kyselinách nepřijímá tkáň žádného barviva.

Jak známo, tvoří převážnou část v kostech i zubovině kollagenní vazivo, které v různě koncentrovaných kyselinách a alkalích ve vodě rozpuštěných velice nabobtná. Toto nabobtnání děje se hlavně přijímáním vody, neboť dle Müllerových nálezů, roztoky alkoholické nebo aetherové bobtnání nevyvolávají.

Další náhled byl ten, že čím slabší roztok kyseliny při odvápnění se použije, tím jemněji působí na tkáň. Tak doporučuje Busch používání 1% roztoku kyseliny dusičné, ale současně udává, že vazivo nabobtná. Podobné údaje vedly Schaffra (Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 1902 B. XIX.) k vědeckému prozkoumání a působení různých kyselin při různých koncentracích na tkáň a na rychlost odvápňování. Dochází k těmto nálezům: 1. Koncentrace musí býti tak volena, aby nenastalo bobtnání a tím poškození tkáně; 2. použitá kyselina musí míti velkou schopnost rozpouštění solí vápenatých; 3. nesmí zanechávat ve tkáni sraženin a musí býti lehce, bez porušení tkáně, z materiálu odstraněna. Z vyšetřovaných kyselin vyvolává kyselina fosforečná, mléčná, mravenčí a octová i v koncentrovaných roztocích veliké bobtnání tkáně, a zároveň mají malou schopnost rozpouštěcí, následkem čehož nejsou doporučitelné jako odvápnidla.

K odvápnění možno použití tudíž hlavně kyseliny solné, dusičné, trichloroctové a siřičité, které mají největší schopnost odvápnovací (rozpuštění solí vápenatých). Kyselina siřičitá zanechává ve tkáni sraženiny, které jsou však ve vodě rozpustné a možno je lehce odstraniti. Byl-li materiál předem fixován formolem, tu kollagenní vazivo v uvedených kyselinách nebobtná. Nejsilnějším rozpustidlem solí vápenatých jest kyselina solná a dusičná v roztoku 3—10%, při čemž vazivo kollagenní nezbobtná.

Delší působení kyseliny solné působí však zhoubně na chromatickou substanci buněčnou, následkem čehož snižuje se schopnost barvení tkání. Z toho důvodu možno uznati za nejlepší roztoky kyseliny dusičné, které nepůsobí tak zhoubně na tkáň a neničí schopnost barvicí. Těto kyseliny možno používat v 2—10% vodním roztoku, nutno však vzíti v úvahu, že 10% ba i 20% roztok neodvápnuje rychleji než roztok 5%, a že silné roztoky, účinkují-li po dlouhou dobu, snižují schopnost barvení. Proto nutno používat roztoků nejvýše 5%.

Po odvápnění ve vodním roztoku kyseliny dusičné nesmíme přenést materiál přímo do vody za účelem vyprání, nýbrž dlužno přenést jej na 12—24 hodin nejlépe do 5% roztoku lithia neb natriumsulfátu, který materiál „odkyslí“, a teprve po neutralisování jest možno vypírati jej dále ve vodě, potom uložit do alkoholu v postupných koncentracích.

Pro jemné preparáty doporučuje Schafffer zalití materiálu do celloidinu, přenést preparát do 85% alkoholu, po utvrzení celloidinu přičezanou kostku vložit do vody za účelem odstranění alkoholu, a pak vložit preparát do 3—5% kys. dusičné na 12—24 hodin (větší předměty déle), nejlépe do nádoby s tak zv. Thomasovým vodním kolem, aby byl preparát neustále v pohybu. Z kyseliny dlužno přenést materiál do 5% roztoku lithia-sulfátu, kterýžto roztok se jednou vymění, a pak vypírati v tekoucí vodě po 24 hodin a odvodnit ve stoupajícím alkoholu do 85%.

Ředění kyseliny dusičné v %.

Kyselina dusičná musí se percentuelně propočítati dle specifické váhy, která jest 1.414; obsahuje tudíž 100 g 68 g kyseliny, 1 g kyseliny nalézá se asi v 1.5 ccm te-

kutiny. Zní-li předpis na použití 5% kyseliny, jest nutno vzítí asi 7·5 *ccm* kyseliny dusičné na 92·5 vody o spec. váze 1·414. Oficielní kyselina dus. obsahuje 30% kyseliny, je tudíž nutno na 5% vodní roztok vzítí 16—17 *ccm* základní kyseliny.

Nejdůležitější tekutiny k odvápnování v literatuře uvedené jsou asi tyto:

Kyselina dusičná v alkoholu. V 70% lihu rozředíme kyselinu dusičnou na 3%. Tvrzené preparáty ponechají se po několik dnů až týdnů v tekutině.

Mayer používá 5% kysel. dusičnou v 90% lihu.

Thoma udává směs 5 dílů alkoholu 95% a jeden díl kys. dusičné koncentrované; tekutinu obnovuje na preparátech po 2—3 dnech. Odvápněný materiál vypírá v 95% alkoholu s přidáním calcium carbonatum tak dlouho, až modrý lakmusový papír v alkoholu nezčervená.

Proti bobtnání materiálu v kyselinách přidává **Gage** kamence. Koncentrovaný roztok kamence nutno na polovinu zřediti a na 20 *ccm* kamencevého roztoku přidá 1 *ccm* kys. dusičné.

Sířičitá kyselina zachovává dle **Zieglera** histologický detail elementů lépe, než ostatní tekutiny odvápnovací. Ve formolu fixovaný materiál přenáší do koncentrovaného roztoku kyseliny sířičité.

Kyselina solná odvápnuje rychle, ale působí zhoubně na tkáň, která bobtná.

Kyselina pikrová odvápnuje velice pomalu a jen malé objekty.

Phloroglucin s kys. dusičnou. (*Intern. Monatschrift f. Anat. und Hist.*, I. Bd. 1884.) Užije-li se phloroglucinu, možno vložití materiál do velice koncentrovaných roztoků kyselin (dusičné neb solné), aniž by měly zhoubného vlivu na tkáň a odvápnují velice rychle.

Anderr mísí koncent. roztok phloroglucinu s 5 až 50% kys. solnou; po odvápnění nutno po delší dobu materiál vypírati v tekoucí vodě.

Bödecker (*Z. f. wiss. Mikr.* 1911) odvápnuje zubní email v malých, asi 0·5 *mm* tlustých kouscích takto: Do 30 *ccm* hustého, v methyalkoholu rozpuštěného celloidinu přidá 10 *ccm* kyseliny dusičné (sp. v. 1·15), kterou důkladně promíchá. Huspenitou masu dobře prohněte a pod tlakem asi 80 *kg* mezi silnými vrstvami filtračního papíru vysuší. Potom celloidin ve dvojnásobném množství

methyllalkoholu opět rozpustí a do něho vloží kousky materiálu, který asi v době 6 dnů se odvápní. V době odvápnování nesmíme s nádobkou s celloidinem pohybovati, jelikož by jinak materiál úplně se rozpadl. Po 6 dnech celloidin sejmutím zátky pozvolna vysoušíme.

Schussik: Průkaz vápna v ossifikacích.

Materiál nutno fixovati jen v alkoholu, pro zmrzlé řezy nutno fixovati jen krátkou dobu as 10 minut v 10% formolu. U embryí stačí již voda k odvápnění.

Pro sole calcia jsou tato barviva používána:

Purpurin, Anthrapurpurin, Haematein, Haematoxylin, Pyrogalol, pro calciumphosfáty stříbrná metoda dle Kossa nebo von Rehl měďhaematoxylin, octan olovnatý, chlorid železa, molybdenan amonatý a chlorid zinečnatý.

Purpurin dle „Grandis Mainimi“.

1. 5—10 minut v koncentrovaném alkoh. purpurinu,
2. několik minut v 0.75 NaCl,
3. vypírati v 70% alkoholu tak dlouho, dokud odcházejí barevné obláčky,
4. 95% alkohol-origanský olej-balsám. (Vápno červené.)

Anthrapurpurin dle Salmona. (Koncentr. purpurin se stopou amoniaku.) Amoniakální Anthrapurpurin s přidáním 1% NaCl, Vápno fialové.

Pyrogalol dle Kossa.

1. 5 minut v roztoku acid. pyrogal. 1%, aquae dest.
- 40, natrii hydroxyd. 0.5,
2. dobře vyprati,
3. alkohol-origanský olej-balsám.

Haematoxylin dle Rehla:

5—10 minut v 1%ním roztoku haematoxylinu, differencovati v destilované vodě se stopou amoniaku dobarviti potom safraninem.

Fosfáty:

1. Řezy se vloží na 30—60 minut za světla do 1—5% dusičnanu stříbrnatého, dobře se vyperou a vloží do sirnatanu sodnat., načež se vyperou a dobarví safraninem. Vápno jest s počátku žluté potom černé.

II. Amoniakální síran měďnatý.

Řezy vloží se do síranu, po vyprání do Weigertova haematoxylinu, po zbarvení differencují se v rozředěné odbarvovací tekutině Weigertově.

III. Methoda barvení chloridem železnatým.

Řezy vloží se na několik minut do 1% chloridu železnatého, řádně se vyperou a vloží do roztoku žluté krevní sole s kyselinou solnou; po vyprání se montují přes alkohol-olej do balsámu. Vápenatění modré.

IV. Molybdenamonium.

Řezy ponoří se na několik vteřin do roztoku dusičnanu molybdeňanu amonatého, načež se vyperou v nakyselené vodě (kyselinou dusičnou). Redukce provede se chloridem zinečnatým. Vápno intensivně modré vazivo slabě modré.

Vyšetřování kostí a zuboviny.

Schaffer (Centr. bl. f. Physiologie 1902).

Utvrzené kosti v alkoholu po případě ve směsi formol-Müllerově tekutině (materiál musí býti dobře vyprán) odvádí ve 3—10% vodní kys. dusičné. Přenese kousky do 5% draselnatého kamence na 24 hodin a pak v tekoucí vodě vypere. Zalévá do celloidinu. Řezy barví silně delafielldským haematoxylinem a vyšetřuje v glycerinu, neb v málo světlo lámajících tekutinách.

Zubovinu vyšetřuje tím způsobem, že nejdříve lístečky zuboviny impregnuje chloridem zlatnatým, pak je odvápní v kys. mravenčí. Barví-li ještě haematoxylinem, tu zbarví se vlákna zuboviny, a pochvy vláken jsou impregnovány zlatem.

Macerační tekutiny.

Jest velice často třeba izolovati z určitého materiálu jednotlivé buňky nebo tkáně; ve stavu živém jsou však buňky navzájem stmeleny a není možno jich od sebe lehece oddělit, izolovati. Za tím účelem nutno vložit tkáň do tekutiny, která tmel mezibuněčný rozpouští, aniž by se nápadně pozměnil tvar buněk a buňky tyto možno potom dobře izolovati. Tekutin k macerování jest velká řada; uvedeme z nich jen nejběžnější:

Müllerova tekutina; možno ji použít v normální koncentraci nebo poněkud zředěné. Malé kousky tkáně vložíme do tekutiny asi na 24 hodin. Po té době možno již izolovati velice lehce jednotlivé elementy. Tato tekutina hodí se nejlépe pro izolování epithelií sliznic, buněk centrálního nervstva a hladkých svalů.

Kyselina chromová v koncentraci 1 : 100 až 1 : 1000; hodí se pro stejné účely jako předešlá.

Roztoku kuchyňské soli 10% užíváme k izolování buněk hladkého svalstva; malé kousky materiálu (stěna žaludku, střeva etc.) ponecháme 24 hod. v tomto roztoku.

Kyselina solná officinální. Těto se používá pro izolování kanálků ledvinných. Malé kousky ledviny vloží se do této kyseliny a ponechají se v ní 10 i více hodin, načež se důkladně vyperou v tekoucí vodě (po 24 hod.). Potom vložíme macerovaný kousek do zkumavky s destilovanou vodou a silně protřepáváme tak dlouho, až tkáň úplně rozpadne; pod mikroskopem vidíme kanálky velice dobře izolované. Možno je barvit Bismarkovou hnědí, vesuvinem nebo eosinem; preparát uschováme v glycerinu.

Kyselina dusičná až 20%. Použití totéž jako u kyseliny solné.

Ranvierův alkohol: 30 ccm alkoholu, 60 ccm destil. vody. Hodí se pro izolování epithelií a nervových buněk. Malé kousky materiálu vloží se na jeden i více dnů do alkoholu; po době macerace trhá se preparát jehlami v řídkém glycerinu.

Methylový alkohol. 20 ccm destil. vody, 10 ccm glycerinu, 1 ccm methylalkoholu. V této tekutině nutno ponechat materiál po dlouhou dobu (i několik neděl). Používá se ho ponejvíce pro izolování podpůrného pojiva centrálního nervstva, retiny a j. Macerovaný materiál vloží se do zkumavky s malým množstvím vody, důkladně se protřepe, načež se vyleje obsah na ptačí skélko, na které nalijeme glycerin a přidáme barvivo (karmín nebo pikrokarmín). Směs dobře promícháme a nabranou kapku prohlížíme pod mikroskopem, kdež nalezneme izolované zbarvené elementy.

Louh draselnatý; používá se ho ve vodném roztoku od 0.1—1% hlavně pro izolování zrohovatělých buněk nehtu, vlasů atd.

Chloralhydrát; 2—5% vodní roztok mace-ruje a zachovává tkáň velice dobře; doporučuje se k isolo-vání hladkých svalů a nervových buněk. Taktéž se do-poručuje směs 5% chloralhydrátu s 0.02% kyselinou chromovou.

Kyselina sírová v 0.6% roztoku hodí se dobře pro sliznice, na izolování vláken čočky atd.

Umělá slina. Rozpustíme 4 g chlorečnanu draselnatého, 3 g chlorečnanu sodnatého, 2 g fosforečnanu sodnatého a 2 g chlorečnanu vápenatého v 1 litru vody, načež nasytíme roztok kyselinou uhličitou a rozředíme 1 litrem vody a 500 ccm Müllerovy tekutiny. Této tekutiny užívá se pro izolování embryonálního svalstva a nervstva, které se nejprve v tekutině roztrhá jehlami a potom protřepe důkladně ve zkumavce. Preparát montuje se do octanu draselnatého (kaliumacetát). Příprava jest dosti obtížná a stejných výsledků obdržíme též jinými jednoduššími methodami.

Jodserum: Tuto tekutinu připravíme si z plovodvé (amniové) tekutiny od zvířat. Do čistého sera, uzavřeného v láhvi, vložíme buď několik krystalků čistého jodu, nebo nakapeme jodové tinktury, při čemž nutno občas tekutinou zatřepati, což opakujeme po několik dnů, načež serum profiltrujeme. Toto serum pro použití musí obsahovati pouze málo jodu; malý kousek materiálu vložíme do tekutiny a již po 24 hodinách zkoušíme, zda možno již elementy izolovati; ne-li, pak nutno přidati ještě trochu jodu a materiál ještě v tekutině ponechati. Jod fixuje tkáň tak, že elementy zůstávají dobře zachovány.

Pikrokarmín Ranvierův (viz pikrokarmín!). Velice pěkných preparátů izolovaných vláken hladkého svalstva obdržíme dle vlastní metody, vložíme-li do pikrokarmínu čerstvé svalstvo žabího žaludku nebo střeva, které pincettou možno lehce v blankách sloupnouti. Po delší době rozmaceruje se svalstvo na jednotlivá vlákna. Macerovaný kousek vložíme do směsi glycerin-voda (2 díly vody, 1 díl glycerinu), ve které izolujeme jehlami na skélku svalová vlákna; tato jsou světle růžová s tmavým jádrem a jsou bezvadně izolována.

Zažívání.

K pokusům zaživacím na čerstvém nebo tvrzeném materiálu, event. již na řezech, používá se buď pepsinu, nebo pankreatinu. Pepsin připravuje se buď ze šťávy žaludeční, nebo ze sliznice žaludku; nejlépe se však doporučuje použití již hotových preparátů.

B e a l e připravuje si pepsin ze žaludeční šťávy prasete, kterou nechá na skleněné desce rychle vyschnouti a sušinu jemně práškuje. Sušina působí po dlouhou dobu. Prášek rozpustí se ve vodě a preparát vloží se na několik hodin do roztoku při teplotě 37°C .

K u s k o w používá roztoku 1 g pepsinu (pepsinum siccum) ve 200 ccm 3% kyseliny šťavelové.

P a n c r e a t i n (P. siccum Grüber) zažívá epithel při 37°C v nasyceném vodním roztoku v několika minutách. Preparátů z celloidinu nebo paraffinu, přilepených pouze vodou (bez bílku), možno dobře použít k pokusům zaživacím, na př. lymfatické uzliny k demonstraci adenoidního vaziva, sleziny atd.

Odbarvování — bílení.

Při vyšetřování vidíme velice často, že různé pigmenty zakrývají tkáň neb elementy, takže jest nemožno detailně jich vyšetřiti. Stává se tak hlavně u nižších, tmavě pigmentovaných zvířat, nebo při vyšetření pigmentovaných orgánů, na př.: chorioideae oka, iris atd., a v případech pathologických za abnormální pigmentace — nádory melanotické. Pigmenty možno odstraniti jen prostředky silně oxydačními. Mnohdy jest nutno odstraniti zabarvení na př. po kys. osmičelé, ve které byly preparáty tvrzeny. V první řadě jde o to, aby prostředek, kterého upotřebíme, neničil tkáň.

Chceme-li odstraniti jemné hnědé zabarvení, dostačí odbarvení, jakého se používá při **W e i g e r t o v ě** metodě na barvení myelinu dle modifikace **P a l l o v y**. (Viz barvení.) Uložíme řez do 0.5% hypermanganu, kde jej ponecháme asi $\frac{1}{2}$ —1 minutu a přeneseme do roztoku $\frac{1}{2}$ % kys. šťavelové s 0.5% siřičitanem sodnatým.

P. M a y e r (Mitth. f. Stat. Neapel 1880, 2. Bd.) odbarvuje s velice dobrým výsledkem volným chlorem; do skleněné nádoby vloží se několik krystalů kaliumchloratum a přidají se 2—3 kapky kyseliny solné. Jak-

míle se počne vyvinovati chlor, nalejeme do nádoby 5 až 10 *ccm* 50% alkoholu. Do této tekutiny vloží se materiál, který byl v 70%—90% lihu uschován; s počátku plave na povrchu, později se potopí. Odbarvení nastane po $\frac{1}{4}$ hodině, po případě až po 2 dnech. Tímto způsobem možno odbarviti i řezy přilepené na bílek. Dle vlastní zkušenosti jest metoda tato velice dobrá.

P. Mayer používá též namísto kalium-chloratum magnesium hyperoxydatum, ke kterému přidá, dle potřeby, více nebo méně kyseliny solné a alkoholu; tato tekutina odbarvuje pomaleji, ale neporušuje tkání.

U n n a doporučuje kysličník vodičitý ve 3% roztoku.

G r e n a c h e r odbarvuje pigment retinální u Cephalopodů ve směsi 1 díl glycerinu, 2 díly 80% alkoholu s přidáním 2—3% kyseliny solné.

S o l n é k y s e l i n y s alkoholem, v různých koncentracích, používá se v různých případech; rovněž tak i směsi kys. solné a kys. dusičné v alkoholu.

E a u d e J a v e l l e. Tekutina tato sice odbarvuje, ale nezachovává vždy tkání; nyní se této tekutiny málo používá.

Výbrusy.

V mnohých případech jest nutno vyšetřiti tkáň, které chovají mnoho organických solí, tudíž tkáň tvrdé, i s uloženými soleni. V histologii přichází to hlavně při vyšetřování kostí a zubů. Z těchto orgánů jest nutno zhotoviti výbrusy tak jemné, aby dovolovaly vyšetření i při silnějším zvětšení.

Jde-li o zhotovení výbrusu kosti, tu seřízne se nejdříve jemnou pilkou lístek asi 0.5—1 *mm* tlustý, buď podélný nebo příčný, dle toho, jak chceme vyšetřovati. Tuto kostěnou ploténku připevníme na tvrdý, úplně rovný podklad (nejlépe užijeme skleněné zátky, která jest na povrchu hladce broušena); kost (nebo zub) přilepíme ku ploše obyčejným pečecním voskem. Nejprve brousíme ploténku kostní na plochém rovném pilníku nebo na hrubozrnném brousku; jakmile obdržíme na kosti rovnou plochu, obrousujeme ploténku dále na velice jemném pilníku nebo smirkovém papíru, nejlépe však na jemném brousku, kde se veškeré hlubší rýhy od dřívějšího hrubého broušení vyrovnají. Je-li povrch ploténky hladký, tu konečně vy-

hladíme jej úplně na filtračním papíru. Vyhlazená plocha jest lesklá. Nyní odstraní se vosk, a po očištění skleněné plochy přilepíme vybroušenou plochu kostní ploténky kanadským balsámem na skleněný podklad. Ploténku nutno dobře k spodině přitisknouti, aby byla úplně rovná. Kanadská pryskyřice, které použijeme k lepení výbrusů, musí býti hustá. Nejlépe si počínáme tak, že nakápneme pryskyřici na sklo, nahřejeme ji na plameni, a na roztavenou přitlačíme výbrus. Kolem ploténky možno ještě nakapati pečtní vosk. Jakmile dobře drží na podkladu, brousíme druhou plochu stejně, jak bylo uvedeno. Broušením docílíme ploténky úplně průhledné.

Je-li hotový výbrus dostatečně tenký, vložíme jej nejdříve do alkoholu, po případě k odstranění pryskyřice do xylolu a pak do alkoholu, při čemž jej štětíčkou očistíme; poté přeneseme jej do alkohol-aetheru, a na konec necháme ploténku na vzduchu úplně vyschnouti. Je-li výbrus dobře očištěn a vyschlý, tu nabývá bílé barvy; při vysychání vniká vzduch do všech kostních kanálků. Takto zhotovený výbrus montujeme úplně za sucha pod krycí skélko, které orámčujeme hustým asfaltovým lakem. (Vložíme-li výbrus do pryskyřice, tu vnikne tato do všech kostních dutinek a kanálků a výbrus stane se úplně průhledným, nepotřebným.) Hodláme-li výbrus montovati do kanadské pryskyřice, musíme ploténku nejprve potáhnouti nějakou látkou, která zabrání prostoupnutí kanady; k tomu účelu natíráme výbrus na všech stranách arabskou klovatinou a po zaschnutí vložíme ho do kanadské pryskyřice.

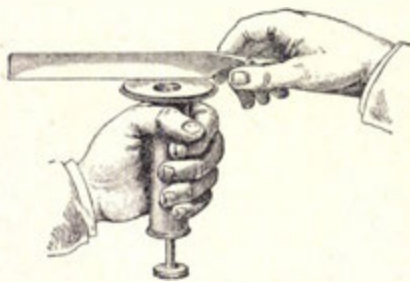
Právě tak, jak počínáme si při výbrusu kosti, pracujeme i na výbrusu zubu. Celý zub upevníme pečtním voskem na skleněný podklad a obrousíme zub (po délce) až do míst, kde objeví se dutina zubu, načež výbrus uhladíme, hladkou stranou přilepíme znova na sklo a obrousíme stranu druhou až do žádané tloušťky. Po očištění a osušení výbrusu montujeme týž buď na suchu, nebo po natření arabskou klovatinou do pryskyřice. Při broušení zubů musíme býti velice opatrní; brousíme bez velkého tlaku, při čemž plocha obroušeného zubu musí býti dobře přilepená, jinak odlamuje se velice křehký email od povrchu zubu.

Velice pěkných a instruktivních obrazů výbrusu kosti i zubů obdržíme, impregnujeme-li kanálky a dutinky

kostní barvou. Methoda je tato: brousíme ploténku kosti tak dlouho, až je úplně tenká a průhledná; tento výbrus úplně vysušený vložíme do koncentrovaného alkoholického roztoku fuchsinu. Roztok fuchsinu přivedeme na vodní neb pískové lázni do varu, při čemž ponecháme výbrus v barvě tak dlouho, až se alkohol úplně odpaří. Celá ploténka kosti jest pokryta vrstvou suché kovově se lesknoucí barvy. Alkoholický roztok fuchsinu vnikne do všech kanálků a buněk a při odpaření barva v kanálcích uschne. Výbrus pak znova brousíme po obou stranách na jemném kameni (z a s u c h a !) a uhladíme konečně na papíře. Hotový suchý preparát montuje se do kanadské pryskyřice. Veškeré kanálky a dutinky jsou ostře konturovány, červeně zbarveny.

VI. Mikrotom.

Mikrotomem nazýváme přístroj, kterým jest možno z preparátu hotoviti velice jemné řezy určité tloušťky. V obchodech nachází se mnoho mikrotomů různých systémů. Některé mikrotomy jsou zařízeny pouze na řezy celloidinové, jiné jenom na řezy paraffinové; některých mikrotomů možno použití pro obojí metodu. Zařízení mikrotomů jest již v principu velice různé; buď nůž pohybuje se stále v určité poloze a proti němu se zvedá



Obr. 42.

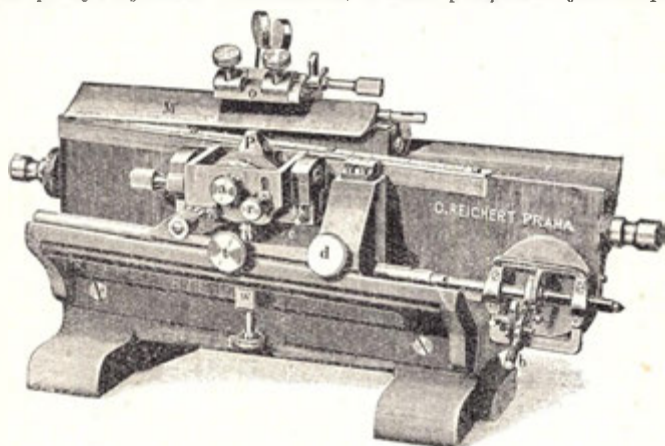
preparát buď šroubem nebo po nakloněné ploše posunovaný, anebo nůž zůstává v pevné poloze a na něj preparát dopadá. U většiny nových mikrotomů posunuje se preparát samočinně do výšky v libovolném rozsahu; na některých přístrojích možno docíliti posunování i o rozdílů půl μ . Nejjednodušší

mikrotom jest nyní velice zřídka používán; je to t. zv. mikrotom *Ranvierův* (obr. 42.). Tento skládá se z dutého válce, ve kterém se šroubem posunuje píst. Na povrchu válce nalézá se rovná, široká plocha. Na píst připevní se preparát, šroubem se pošine píst do určité výšky a rovným nožem, který se položí na horní plochu, seřízne se část preparátu nad plochu vyčnívající. Byl to jeden z prvních mikrotomů, který měl nahraditi řezání *prosté*. Podobně zařízen jest mikrotom *Reichertův* pro řezání *prosté*, který má ve válci svorky na upnutí preparátu.

Mikrotom tento možno doporučiti, neboť úplně stačí na obyčejné a rychlé vyšetření, obzvláště v praxi lékařově, když jde jenom o pouhé a rychlé rozpoznání (na př. nádorů). Možno jím řezati nejen konservovaný materiál

v alkoholu bez zalití do paraffinu nebo celloidinu, ale i materiál zalitý. *Takto zařízený mikrotom jest velice levný a postačí úplně.* Hodláme-li řezati preparát nezalitý, tu vložíme jej mezi dva špalíčky z t. zv. „bezové duše“, svorkou jej stiskneme a řezeme i s dření bezovou, která se ve vodě neb líhu odstraní. Na principu prostého vedení nože bylo sestrojeno množství mikrotomů, i tak velkých, že řezány jimi i celé mozky (Mikrotom Gudenův).

Druhý princip, kde nůž jest připečen na těžký, železný klín, pohybující se v sáňkách, a kde preparát jest zapečen



Obr. 43.

do svorky, která se různým způsobem do výšky posunuje, jest princip *Rivertův*. Na principu *Rivertově* jsou sestaveny téměř všechny mikrotomy, které nesou různá pojmenování, hlavně podle firem, které je s různými modifikacemi vyrábějí (Jung, Schantze, Reichert, Zimmermann atd.). Jiný mikrotom, tomuto podobný, jest mikrotom sáňkový. Poněvadž jest velice důležité seznámiti se s různými druhy mikrotomů, chei se o několika druzích zevrubněji zmíniti.

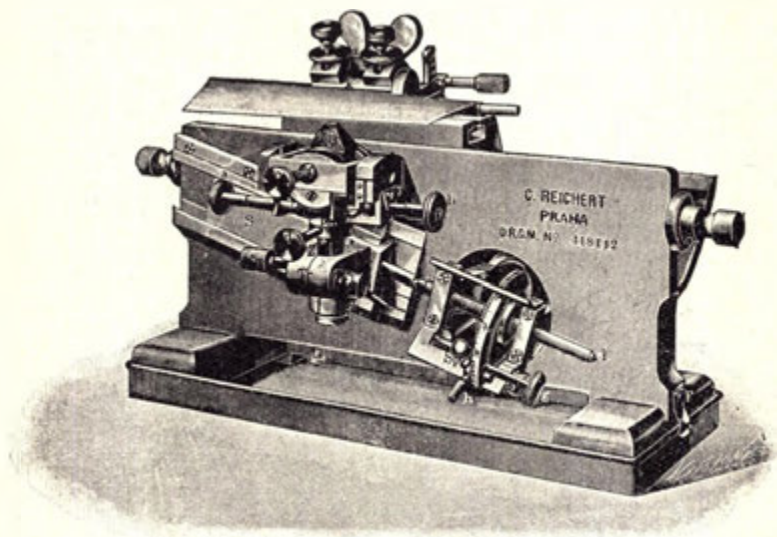
Sáňkový mikrotom se šikmou plochou t. zv. *Jungův*. Na větším podstavci — za účelem větší stability — jest kolmo připevněna massivní plotna (obr. 43.); na plotně na straně pravé probíhá pod ostrým úhlem lišta, která tvoří s kolmou plochou dráhu pro sánky. V dráze pohybuje se těžký železný klín, sánky, na který se šrou-

bem připevní nůž. Sáňky musí přesně na dráhu naléhati a lehce se po ní pohybovati; aby tření se zmenšilo, nedoléhají sáňky plnou plochou na dráhu, nýbrž spočívají jen na několika bodech třecích. Na straně levé jest připevněna na kolmou stěnu rovněž pod ostrým úhlem probíhající jiná lišta, která jest skloněna nazad a tvoří dráhu, ve které se pohybuje jiný těžký, železný klín; t. j. t. zv. sáňky pro objekt. Na tomto klínu připevněna jest zvláštní svorka k upevnění preparátů. Poněvadž tato dráha tvoří nakloněnou plochu se sklonem od předu dozadu, musí nutně preparát, který do svorky sánek jest zapíat, pošunutím dopředu vystoupiti do výšky. Jiná důležitá součást mikrotomu sáňkového jest mikrometrický šroub, který, na svorce upevněn, nalézá se za sáňkami pro objekt. Zařízen je tak, že možno svorku se šroubem upevniti na dráze sánek. Mikrometrický šroub, který nejprv celý nazpět vytočíme, posunujeme k sáňkám objektům tak dlouho, až se jich hrotem dotýká. Připevníme-li šroub v dráze a otáčíme-li jím, posunujeme klín s preparátem dopředu a do výšky. Když známe úhel skloněné plochy a výšky šroubovice, lehce si vypočteme, o kolik částí milimetru vystoupí preparát do výše při jednom otočení šroubu. U mikrotomu „Jung“ jest výška šroubovice taková, že jedno úplné otočení šroubu posune sáňky objektu dopředu o tolik, že preparát vystoupí o $15\ \mu$. Na šroubu jest připevněna větší deštička zářezy rozdělená na 15 dílků, do kterých zapadá pružné péro; péro udává, o kolik zářezů — zoubků — se kolečko otočilo. Když rozdělení kolečka vykazuje 15 zářezů, tu otočením kolečka o jeden dílek — totiž od jednoho zářezu ke druhému — zvedneme preparát o $1\ \mu$.

Podobně jsou zařízeny sáňkové mikrotomy se šikmou drahou jiných firem, až na některé malé úchytky, které možno ihned postřehnouti.

Mikrotom Albrechtův (obr. 44.) vyrábí fa. Reichert; jest sestaven na podkladě šikmých sánek, ve kterých se pohybuje svorka pro preparát. V sáňkách jest volně uložena dlouhá pohyblivá kovová tyčinka, která se v nich upevní šroubem, a to tehdy, když dotýká se jemného posunovacího šroubu. U mikrotomů, kde posunování děje se jemným šroubem, jest nutno tento vytočiti zpět do původního postavení, když došel ke konci. U mikrotomu Albrechtova je této vadě zpětného vytáčení šroubu

velice dobře odpomoženo. Končí-li u tohoto přístroje šroub, možno celý posunovací přístroj otočiti kolem osy, čímž zadní konec šroubu dostane se kupředu. Dříve uvedenou pohyblivou tyčinku v sáních uloženou uvolníme a posuneme tak, aby se opět dotýkala šroubu, čímž možno znovu preparát posunovati do výšky. Při otáčení šroubu a posunování tyčinky není nikterak dotčena poloha preparátu, takže možno tento dále řezati, aniž pozorujeme,



Obr. 44.

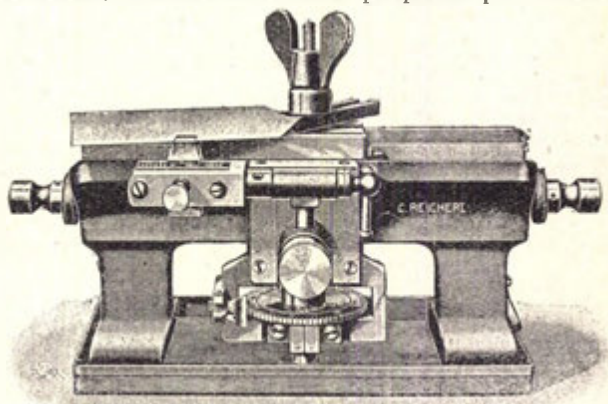
že nůž seřízl tlustší řez, nebo že vůbec neseřízl, jako se stává u mnohých jiných strojů.

Sánky pro nůž jsou stavěny podobně jako u mikrotomu Jungova s tím rozdílem, že šikmá plocha jest na straně zevní, kolmá pak na straně vnitřní. Zařízení toto má tu výhodu, že nůž nalézá oporu v kolmé ploše a nezvedá se při řezání tvrdých preparátů, na př. při řezání chrupavek, kostí — v botanice při řezání různých dřev.

Mikrotomu možno použítí pro řezání materiálu jak v celloidinu, tak i v paraffinu zalitého.

Sánkový mikrotom s kolmým posunováním preparátu. Mikrotom Beckrův.

Na pevném podstavci jest kolmo postavena deska, která má na své pravé straně připevněnu lištu, tvořící dráhu saněk pro nůž; na levé straně jsou dvě kolmé lišty, ve kterých se posunuje ploténka se svorkou pro objekt. Pod svorkou uložen jest jemný šroub, který při otáčení svorku zvedá. Poněvadž otáčení šroubu přenáší se přímo na svorku, vystupuje preparát rychle do výšky. Aby zvedání bylo jemné, má šroub na svém dolním konci velkou kulatou desku, na obvodu zoubkovanou (obr. 45.). Při známé výšce šroubovice a počtu zubů na desce, jest možno určit, o kolik se zvedne preparát při otočení ko-



Obr. 45.

lečka o jeden zoubek. Toto zvednutí činí obvykle $2\ \mu$ (u přístroje firmy Reichert). Otáčení ozubeného kolečka o určitý počet zoubků děje se buď prostě rukou, nebo jest u mikrotomu t. zv. automatické posunovadlo; sáňky pro nůž narážejí totiž na hrot, který pákou, jejíž konec zapadá do zoubků kolečka, otáčí toto o určitý počet zubů, a tím preparát zvedá. Hrot možno posunovati a na něm jest vyznačeno v číslech, o kolik zoubků se kolečko při určité délce hrotu posune. Zařízení toto jest velmi praktické.

S v o r k y o b j e k t n í. Zapneme-li preparát do svorky, tu vidíme mnohdy, že je třeba skloniti preparát na tu neb onu stranu, abychom docílili správného řezu. V obvyklém svorec jest otáčení preparátu velice obtížné. Nevýhodu tuto odstraní různé zařízené svorky. Jeden

druh jsou t. zv. svorky kulovité; čep, na kterém vlastní svorka jest připevněna, má kulovité zakončení, uložené do kulovitého ložiska; tím umožněn na svorec pohyb různými směry. Vada svorky kulovité záleží v tom, že její upevnění není tak dokonalé, jak mnohdy materiál vyžaduje.

Jiná, mnohem stabilnější svorka jest t. zv. „neapolská“. Tato svorka dovoluje dvěma nekonečnými šrouby, zasahujícími do šroubovice na úsečkách kruhovitých, pohyb preparátů ve dvou hlavních směrech; kombinací obou možno pak libovolně preparát ustavit.

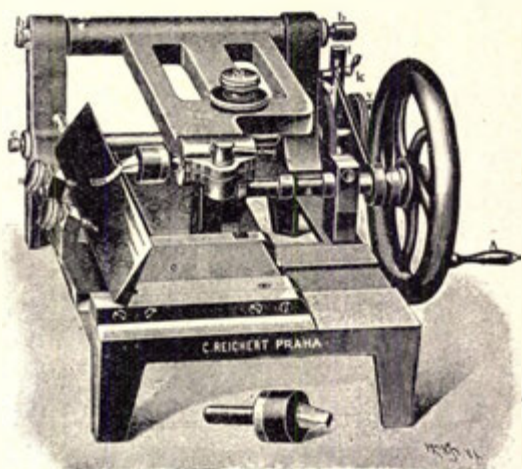
U p e v n ě n í n o ž e. Na jmenovaných mikrotomech se nůž připevní obyčejně šroubem k sáňkám, zůstává tudíž sklon nože k preparátu vždy týž. V mnohých případech však, jak později bude uvedeno, jest nutno různé sklonit nůž k preparátu; toho docílujeme zvláštní svorkou, která se nejdříve šroubem na sánky připevní; do této vloží se nůž, který dvěma šrouby se utáhne. Svorka dovoluje, aby ostří nože bylo do různé polohy skloněno. Jiné svorky dovolují, aby nůž stál úplně napříč, totiž kolmo na podélnou osu mikrotomu; postavení toto jest nutné k řezání řezů v paraffinu.

Jmenované mikrotomy jsou hlavně k řezům z celloidinu; leč možno jich užití též k řezům z paraffinu, máme-li svorku na příčné postavení nože.

U jiného druhu mikrotomů, kterých se používá hlavně na řezy paraffinové, nepohybuje se nůž na sáňkách, nýbrž jest pevně zasazen a posouvá se automaticky jemným mikrometrickým šroubem směrem k preparátu, který na něj dopadá.

Tak zařízen jest t. zv. „Rockingmikrotom“ (obr. 46.). Na dvojramenné páce jest připevněn preparát; páka se zvedá excentricky uloženou osou velkého kolečka a dopadá ustavičně na totéž místo; kdykoliv dopadne preparát na ostří nože, seřízne se z něho řez. Při dalším otočení posune se nůž o určitý počet zoubků samočinně proti preparátu, a to v době, kdy páka s preparátem se zvedá; než tato dopadne, jest nůž již posunut a preparát opět se odřízne. Tímto přístrojem rychle zhotovíme z preparátu vhodně upraveného velký počet jemných, stejně tlustých řezů od 1 až do 20 μ tloušťky. Mikrotom Rockingův zatlačen nyní jinými druhy, hlavně mikrotomem dle M i n o t a.

Mikrotom Minotův firmy „Zimmermann“ v Lipsku jest zřízen i na větší v paraffinu zalité objekty, a možno jím řezati též preparáty, zalité v celloidinu. Tento mikrotom má nůž úplně stabilní; preparát jest připevněn na železném válečku, který jest zapjat do sáněk. Tyto sánky se přivedou *e x c e n t r e m* do pohybu nahoru a dolů; preparát přejde přes nůž, seřízne se a opět vystoupí se sánkami. Při tom však samočinně zasáhne páka do ozubeného kolečka, které se otočí o určitý počet μ a posune

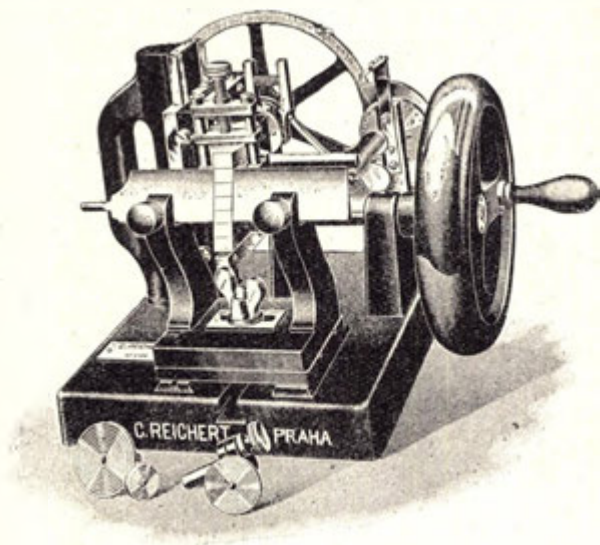


Obr. 46.

preparát dopředu. Mikrotom Minotův jest velice stabilní a precisní, umožňuje posunování od 5μ až do 30μ i více. Tento mikrotom vykazoval ještě některé nedostatky, které byly *M i n o t e m* opraveny, a takto opravený přístroj vyrábí *f a. R e i c h e r t* (obr. 47.). Zlepšení záleží předně v automatickém posunovači, který je spojen velkým ozubeným kolem, posunutí o jeden zoubek dělá 1μ . Další úprava záleží v tom, že mikrometrický šroub posunovací jest upevněn do matky, kterou možno na způsob kleští otevřít, a tak se šroub lehce posune nazpět, aniž se musí šroubem otáčeti. Nůž jest upevněn ve svorce, kterou možno skláněti.

Vedle jmenovaných mikrotomů, které jsou poměrně dosti drahé, vyrábějí se mikrotomy menší a jednodušejí zařízené, t. zv. studentské mikrotomy. Jung vyrábí podobné přístroje na principu Ranvierova ručního mikrotomu; lze jej připevniti k desce stolu a má buď samočinné zdvihadlo nebo posunuje se rukou.

Podobný malý přístroj vyrábí firma Reichertova; do něho možno zapnouti různé nože, břitvu a p. a řezati v paraffinu neb celloidinu. K těmto mikrotomům můžeme

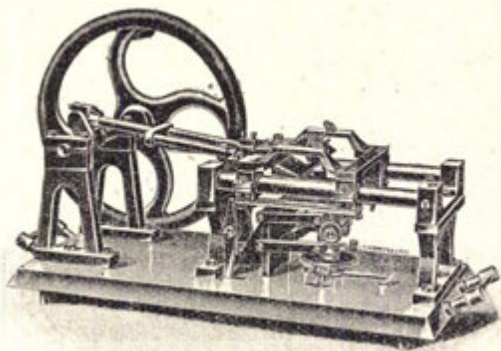


Obr. 47.

použití přístroje na mrznutí preparátu etherem neb kyselinou uhličitou. Místo svorky na zapnutí preparátu jest dutý hranol, ve kterém jest uloženo „spray“. Z nádobky, naplněné etherem, vedeme gumovou rourkou ether do dutého hranolu, ve kterém tento gumovým balonkem rozprašujeme. Ether působí zmrznutí menšího preparátu, uloženého na vrchní vroubkované desce hranolu. Řez preparátu sejmemе opatrně s nože, vložíme do fyziologického roztoku, rozprostřeme jej a lžičkou přeneseme buď do lihu nebo do barvy (barví se i za čerstva, hlavně

tehdy, jde-li o reakce, na př. amyloidní, na glykogen atd.). Řezy takto zhotovené hodí se jen pro rychlou orientaci.

Sartorius (Göttingen) vyrábí mikrotomy, které jsou stavěny na principu válcovém (jako vidíme u parních strojů), kde nůž se pohybuje ve zvláště upravených sáňkách pomocí válců (obr. 48.). Jiný druh mikrotomu je ten, na kterém možno řezati velké, ve tvrdém parafinu zalité preparáty, jakož i jemné řezy z různých druhů dřev.

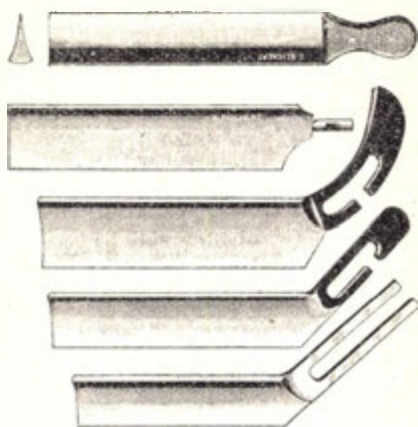


Obr. 48.

Mikrotomové nože.

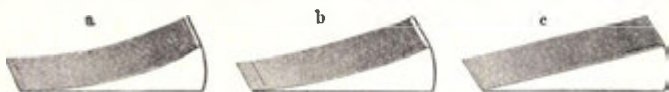
Velice důležitou součástí mikrotomu jest nůž; na jakosti nože závisí též jakost řezů. Nože mikrotomové mají různou formu, která odpovídá vždy stavbě toho kterého mikrotomu. Zevní formou liší se nože hlavně dle toho, zapínají-li se přímo na sáňky šroubem nebo do svorky, která teprve se připevní na sáňky (obr. 49.). První druh má držadlo zahnuté, ve kterém jest výřez pro šroub. Některé nože postrádají úplně držadla. Každý nůž jest klín, buď protáhlejší, tudíž na hřbetě tenší, nebo plochy jeho rychle k sobě se sklánějí, tudíž na hřbetě při stejné šířce nože silnější (obr. 50.). Broušení klínů jest rovněž rozdílné; buď jsou obě plochy úplně rovné, nebo jest spodní plocha rovná, horní pak dutě vybroušená, nebo jsou obě plochy dutě broušeny. Ostří nože nebrousí se tím způsobem, že by se obě plochy, klín nože tvořící, vybrousily do úplného ostří; nůž brousí se se strany spodní úplně

rovně, na straně horní však ostří vytvoří se novým klínem, docela malým, který se sklání pod určitým úhlem k ploše nože; je to velice důležité pro opětné broušení nože a dlužno hleděti k tomu, aby broušení dělo se vždy stejně. Za tím účelem zašroubuje se nůž do válečkového držadla; váleček při broušení leží na bruse, čímž udržuje se stále stejný sklon. Broušení mikrotomových nožů vyžaduje velkého eviku a trpělivosti. Na ostří nesmí býti t. zv. „jehly“ ani zubů; o bezvadném ostří se přesvědčíme, prohlédneme-li je pod mikroskopem asi při $100\times$ zvětšení.



Obr. 49.

Preparáty, které byly zality do celloidinu, řežeme nožem, jehož klín je tenký, na horní straně dutě broušený; je-li objekt tvrdší, tu nutno vzíti nůž silnější. Na



Obr. 50.

řezy paraffinové jsou výhodnější nože krátké, ale silné, které se neprohýbají a jsou z obou stran ploché. Nože takové vyrábějí různé firmy, a jest vždy nutno udati, zda žádáme nůž pro celloidin či paraffin.

VII. Příprava a montování preparátů.

Skélka podložní a krycí.

Skla podložní i krycí mají býti z dobrého materiálu, bezvadná, to jest musí býti čistá, průhledná, bez kazů (ne zelená!). Nejlepší skélka se zhotovují ze skla solingen-ského a jejich hrany se obrušují nebo hladí. Jak podložní, tak i krycí skélka přicházejí do obchodu v různých, dle určité délky se třídících formátech, z nichž nejnáměšší je tak zvaný formát anglický, vídeňský a giessenský. Skélka podložní giessenského formátu jsou 48 mm dlouhá a 28 mm široká, vídeňského formátu 65 × 26 mm, anglického formátu 76 × 26 mm. Dále jest zvláštní velký formát 87 × 37 a 87 × 55. Různým formátům skel podložních odpovídá různá velikost skel krycích, která jsou řezána buď do čtverce, obdélníka, nebo do kruhu. Míry běžné jsou do čtverce: 12, 15, 18, 21 a 24 mm, těchž měr jsou průměry skel kulatých. Nejběžnější obdélníkové míry jsou: 24 × 21, 32 × 24, 50 × 40. Obvyčně žádaná tloušťka krycích skel bývá mezi 0.15—0.22 mm, pro vyšetřování homogenní immersí mají býti skélka nejvýše 0.1 tlustá. (Viz str. 17.)

Dříve než použijeme skel, jest nutno, aby byla úplně čistá. Velice často dostaneme v obchodech skla, hlavně krycí, která jsou téměř neprůhledná, jako by byla zamžená, mnohdy až mlékovitě zbarvená. To stává se tehdy, leží-li skla po delší dobu na skladě. Krycí skélka jsou vyráběna z velice měkkého skla, a během doby vykrystalují na jich povrchu soli ve skle obsažené. Skélka takto „naběhlá“ čistíme tak, že je vložíme do slabé kyseliny (nejlépe solné as 3%), načež je omyjeme destilovanou vodou a ponoříme do lihu. Sušíme je plátnem nebo hedvábným hadříkem. Skélka musí býti naprosto čistá, hlavně tehdy, kladou-li se na ně seriové řezy z paraffinu nebo celloidinu. Tloušťka skel má býti pokud možno nejmenší. Na tloušťce skélka krycího záleží velice mnoho, hlavně proto, poněvadž jsou na určitou tloušťku krycího skélka zhotoveny různé systé-

my objektivních čoček. Jsou to hlavně objektivy apochromatické. Použijeme-li silnějších skel krycích, než jak jest udáno pro ten neb onen objektiv, pak obdržíme obraz preparátu nezřetelný, jakoby rozmazaný. Jak již při objektivcech uvedeno, jsou silnější čočky opatřeny zvláštním zařízením, t. zv. korrekčním kruhem, kterým možno regulovati objektiv při tlustším krycím skélku. (Viz str. 30.)

Všeobecné o přípravě trvalých preparátů.

Každý řez, který chceme uschovati jako trvalý preparát, ať jest již řezán v celloidinu nebo paraffinu, musí býti uložen v jistém prostředí. Obyčejně to jsou pryskyřičnaté látky, zřídka kdy glycerin, nebo jiná tekutina.

Dříve však, než jest možno uložiti řez do pryskyřice, musí projíti různými látkami, nakonec pak takovými, které vložení do pryskyřice dovolí. Voda nebo alkohol sráží na př. kanadský balsám, zato však se pryskyřice dobře snáší s různými oleji, s xylolem atd. Postup ke zhotovení trvalého preparátu, uloženého v pryskyřici, je tento:

1. Řez, který uložen jest v alkoholu, přeneseme lopatičkou do destil. vody (není-li předpis pro barvení přímo z lihu); řez tento následkem diffuse lihu počne se na vodě rychle pohybovati. Je-li řez příliš tenký, může se různě stočiti a přeházeti tak, že není již k potřebě. Chceme-li tomu zabrániti, přeneseme jej nejdříve do směsi alkoholu a vody, a pak teprve do čisté vody.

2. Z vody přeneseme řez do připravené barvy (na př. Haematein kamencový).

3. Z barvy přeneseme řez do vody. Ve vodě zůstane tak dlouho, až veškerá přebytná barva se z řezu vyloučí; jest radno řez ještě jednou přenést do čisté vody.

4. Z vody přeneseme obarvený řez do 96% lihu, který po několika minutách vyměníme; děje se tak za tím účelem, aby veškerá voda z preparátu byla odstraněna — preparát se odvodní.

5. Dobře odvodněný preparát přeneseme lopatičkou do prosvětlujícího oleje, nejlépe do origánského. V oleji plave řez nejdříve na povrchu, později, když olej řezem úplně pronikl, se ponoří.

6. Prosvícený řez přeneseme lopatíčkou na podložní skélko a veškeren přebytkový olej odstraníme nahnutím skélka.

7. Po odstranění oleje z preparátu nakápneme na řez kanadský balsám a na tuto kapku přiložíme krycí skélko.

Vady, které se při tomto pochodu vyskytují, záleží hlavně v tom, že preparát nebývá úplně odvodněn; to poznáváme ihned, jakmile přeneseme řez z lihu do oleje. V oněch místech, kde zůstala ještě voda a kam olej nemohl vniknouti, objeví se bílé neprůhledné skvrny a preparát se neprosvítí. Na řezech celloidinových zůstává často celloidin mlékovitě bílý, voda z celloidinu nebyla vytlačena. V takovém případě nutno přenést řez z oleje nazpět do lihu a pak opět do oleje. V některých případech nepozorujeme zkalení řezu v oleji; když však přikryjeme řez již v pryskyřici uložený, tu objeví se buď zkalená místa neb malé krůpěje. To stává se tehdy, když oleje bylo dlouho používáno a s preparáty bylo do něho přeneseno mnoho alkoholu; tento alkohol teprve dodatečně sráží kanadskou pryskyřici. V takovém případě nutno na řez, který zůstane na sklíčku podložním v kanadě uložený, nakapatí xylol, by se veškerý kanadský balsám rozpustil a odstranil; potom možno znovu, není-li řez po xylolu zkalený kanadskou pryskyřicí, preparát přikrýti. Není tudíž radno oleje prosvětlovacího používati po dlouho dobu, neboť bývá již alkoholem prosycený, a tento sráží pryskyřici, která jest v něm nerozpustná.

Někdy pozorujeme na řezu tečkovitá neb lineární místa nezbarvená; to stává se tehdy, když použito bylo jehly, kterou jsme řez z vody vyjímali, olejem znečištěné. Olej s jehly byl přenesen na preparát a nedovolil přístup vodné barvy do preparátu. Jehly preparační nutno vždy očistiti, jakmile přišly ve styk s olejem.

Trvalé preparáty montované v glycerinu.

V některých případech není radno používati k montování kanadského balsámu, jelikož se v něm pro velký lom světla ztrácejí jemné detaily v preparátě. Takový preparát ukládáme do rozředěného glycerinu tímto způsobem: Řezy, buď zbarvené nebo nezbarvené, přeneseme z vody do misky se směsí glycerinu a vody v poměru 1 : 1, nebo dva díly glycerinu a jeden díl vody. Po době

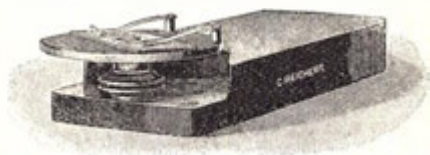
několika minut (nebo déle) přeneseme řez na podložní sklíčko, přihlížejíce k tomu, aby se nepřeneslo na skélko příliš mnoho glycerinu. Řez přikryjeme krycím skélkem, na jehož spodní stranu dáme malou kapku glycerinu proto, aby nezůstaly vzduchové bublinky v preparátě.

Krycí skélko nedrží však pevně na preparátě, tekutina by po nějakém čase vyschla a preparát stal by se tím nepotřebným. Preparáty v glycerinu uložené je třeba orámečkovati, což činíme různým způsobem. Nejlépe se k tomu hodí t. zv. asfaltový lak (železný lak), který máme uschovaný v lahvičce se širokým hrdlem. Musí býti syru-povitě konsistence, ne příliš tekutý. Sklo podložní kolem krycího skélka nutno důkladně očistiti, aby nebylo znečištěno od glycerinu (proto se hledí vzíti s preparátem co nejmeně glycerinu, aby pod skélkem krycím nevytékal navenek). Pak vedeme štětec v asfaltu namočený po okraji krycího skélka; tím způsobem zhotovíme rámeček kolem preparátu. Lak nesmí býti příliš tekutý, aby nepřetekl přes skélko nebo nevnikl pod skélko krycí na řez. Rámeček asfaltový rozšíříme as na 3 mm po skélku podložním.

Toto montování preparátu do glycerinu a orámečkování asfaltem vyžaduje dosti eviku.

Pohodlnější orámečkování preparátu umožňuje přístroj (obr. 51.), který skládá se z dřevěného podstavce, na němž upevněna kulatá deska, lehce otáčivá, která má kruhové dělení. Přikryjeme-li preparát v glycerinu uložený kulatým skélkem, tu položíme podložní sklo na destičku tak, aby kulaté krycí skélko krylo se přesně s kruhem na desce vyrytým. Namočíme štětec do asfaltového laku, levou rukou otáčíme desku, při čemž pravou rukou přidržujeme štětec na okraji krycího skélka, a tak snadno orámečujeme preparát.

Nemá-li řez v glycerinu býti uschován na dlouhou dobu, nýbrž má-li býti jen na krátký čas pro vyšetření před vyseknutím chráněn, možno zhotoviti rámeček z paraffinu. Silnější drát, nebo malou lžičku nahřejeme nad plamenem, vložíme do paraffinu a kapku tekutého paraf-



Obr. 51.

finu položíme nejprve na rohy krycího skélka. Tím připevní se poněkud skélko a nyní klademe teplý paraffin na hrany krycího skélka.

Podobně možno orámečkovati preparát směsí žlutého vosku a kolofonia. 2 díly vosku a 7—9 dílů kolofonia za tepla důkladně promísíme a ke směsi přidáme trochu rumělky v prášku. Směs necháme vychladnouti. Rámeček, který je trvalý, zhotovujeme stejným způsobem jako u paraffinu.

Hlavní podmínkou trvanlivosti rámečků jest naprostá čistota skélka, aby adheze mezi sklem a lakem nebo voskem byla úplná. Zůstane-li na skle glycerin, rámeček se velice snadno odloupává.

Montování velkých řezů.

Velké řezy, které jsou také značně tlustší, kterých se má použití pro demonstraci, uzavírá S c h e n k tímto způsobem: Řez nechá úplně prosáknouti glycerinem. Když se stal průhledným, vloží se mezi filtrační papír a odstraní se z něho veškeren přebytečný glycerin. Potom položí se řez na podložní sklo a nakape se naň řídký, v xylolu rozpuštěný kanadský balsám, odstraní se velké bublinky vzduchové a přikryje se krycím sklem. Kanadská pryskyřice obleje celý preparát, který zůstal úplně průhledný, jenom tehdy, byl-li přebytečný glycerin odstraněn. Toto montování velkých řezů se velice dobře osvědčuje.

VIII. Příprava k hotovení řezů jednotlivých a seriových.

Jak již dříve uvedeno, možno jen částky průhledné, světlo dostatečně propouštějící, mikroskopicky vyšetřovati, nehledíce ovšem ke zkoumání, kdy vyšetřujeme ve světle dopadajícím a ne prostupujícím. Při největší jistotě řezání z volné ruky břitvou nebo plochým nožem jest přece jen velice obtížno obdržeti stejně tlusté řezy a vůbec nemožno — zejména při malých objektech — řezati materiál z volné ruky na serie. Aby se docílilo vhodných řezů, bylo hledáno odedávna nějaké prostředí, do kterého by se preparát uložil, aby mohl býti řezán. Tak užíváno dříve na př. mýdla, do něhož byl preparát zalit, a pak řezán (do techniky zavedl mýdlo Flemming). Podobných prostředí byla velká řada. Později bylo používáno vosku s olejem; do této směsi byl preparát pro další zpracování vložen. Avšak práce s veškerými těmito prostředky byla velice nesnadná. Velmi dobře se osvědčil paraffin a dosud jest v mnohých případech, hlavně pro malé a embryologické objekty, užíván. Pro objekty větší, zvláště však pro takové, které složeny jsou ze tkane různé tuhosti, osvědčilo se nejlépe zalévání do celloidinu. Jak paraffinu, tak celloidinu užívá se s prospěchem proto, že jsou to látky naprosto objekt prostupující, které se stávají s objektem jednolitými, nerozpadávají se a nedrobí.

A. Methoda zalévání preparátů do celloidinu.

Celloidin (rozpuštěná střelná bavlna v etheru) dostává se do obchodu v tuhých a elastických tabulkách. Celloidin rozkrájí se na malé kousky, které se rozpouštějí ve směsi alkohol-etherové, a to jednoho dílu alkoholu a dvou dílů etheru. Rozpuštěný celloidin uschováme v láhvi dobře zátkované; roztok základní musí míti hustotu syru. Ze základního roztoku připravíme roztoky různé koncentrované. Při zalévání preparátů do celloidinu počínáme vždy s roztokem velice řídkým, neboť jen takový

roztok může prostoupiti preparát, vyplniti veškeré dutinky a prostory mezi tkání. Hustého roztoku upotřebíme ke konečnému zalití, neboť tvoří pouze vrstvu kolem preparátu a vnikne jen do velkých, od povrchu přístupných dutin.

Příprava preparátu pro zalití do celloidinu.

Preparát musí býti velice dobře odvodněn, je tudíž nutno, aby materiál byl alespoň dvakráte přeložen do absolutního (nebo aspoň spolehlivě do 96%) lihu. Z lihu přeneseme preparát do směsi alkoholu a aetheru, ve které jej necháme podle velikosti 2—24 hodiny ležeti. Ze směsi alkohol-aetherové uloží se preparát do řídkého roztoku celloidinu, nebo postupuje se tak, že k preparátu, který jest uložen ve směsi alkohol-aetherové, přidáme velice málo základního roztoku celloidinu, aby povstal roztok řídký. V řídkém celloidinu necháme preparát po nějakou dobu ležeti, čím déle, tím lépe. Jest naprosto nemožno udati, jak dlouho má preparát v celloidinu ležeti; doba ta jest závislá hlavně na hustotě vaziva, ze kterého jest dotyčný preparát složen. Tak na př. játra, která jsou orgán dosti jednolitý, možno mnohem dříve z celloidinu vyjmouti, než kůži, ve které nacházíme jednak tuhé a husté vazivo ve škáře, do kterého roztok velice pomalu vniká, jednak vazivo řídké, které daleko lépe celloidin propouští. Cvikem naučíme se usuzovati, jak dlouho ten který materiál dlužno ponechati v řídkém celloidinu. Zalíváme vždy úřezky pokud možno malé. Z preparátu, který jest po ploše větších dimensí, dlužno zalévati pouze tenké „lístky“. Hodláme-li na př. zhotoviti řezy celou ledvinou králíka, tu ledvinu utvrdíme a rozřízneme v polovině tak, aby plocha řezu byla rovná. Potom seřízneme lístek paralelně s prvním řezem asi 2—3 mm silný, který vložíme do řídkého celloidinu.

K roztoku celloidinu, ve kterém jest preparát uložen, přidáme za jeden nebo dva dny trochu celloidinu hustého, ale opět jen tolik, aby roztok jen nepatrně zhoustl. Za několik dní můžeme preparát přeložiti do roztoku hustého (syrupového), a to tak, že do skleněné nádobky s plochým dnem, do které nalejeme hustý celloidin, vložíme preparát, řídkým celloidinem již prosáklý. Nádobku přikryjeme s počátku tak, aby se nemohla směs alkoholu a aetheru rychle

odpařovati. Když vkládáme preparát z řídkého celloidinu do hustého, objeví se obyčejně v hustém celloidinu ve hloubi veliký počet vzduchových bublinek, které nutno dostati na povrch, aby se ztratily; toho dosáhneme tím způsobem, že nádobku důkladně přikryjeme. Jakmile se bublinky vzduchové vytratí, přikryjeme nádobku jen lehce, totiž tak, aby se směs alkoholu a aetheru docela pomalu odpařovala. Odpařováním celloidin houstne. Necháme jej tak dlouho vysychati, až nabude konsistence tuhé a elastické, podobné, jako má v tabulce. Stává se, že při rychlém vypařování se směsi alkoholu a aetheru ztverdne celloidin na povrchu, ve vrstvě hlubší však zůstává úplně měkký; tu radno obrátiti nádobku otvorem dolů. Páry aetherové, jsouce těžké, klesají dolů a rozpouštějí ztvrdlou vrstvu, čímž celloidin se stane stejnoměrně tuhým. Jakmile celá vrstva celloidinu s preparátem stejnoměrně ztuhla, vyřízneme tento, ponecháme však kolem něho vrstvu celloidinu. Takový špalíček celloidinu s preparátem vložíme na okamžik do směsi alkoholu a aetheru, čímž změkne povrchní vrstva celloidinu; ponoříme pak preparát do celloidinu hustého a přiložíme ho na dřevěný nebo, jak častěji se užívá, na stabilitový špalíček. Posečkáme malou chvilku, aby celloidin poněkud oschl, a vložíme přilepený preparát do 70% lihu. V lihu utvrdne preparát respekt. celloidin za několik hodin a pak možno jej řezati. Tato metoda zalévání do celloidinu jest dle zkušenosti nejsprávnější.

Pro zalévání do celloidinu možno použití též starší metody, která spočívá v tom, že preparát, řídkým celloidinem prosáklý, oblejeme celloidinem hustým přímo na stabilitovém nebo dřevěném podkladu, a po nějaké době, když celloidin na povrchu ztuhl, vložíme jej ihned do 70% alkoholu.

Podkladem preparátů (aby bylo možno zapnouti je do svorky mikrotomu) jsou dřevěné špalíčky, pokud možno málo pórovité, a špalíčky z vulkanisované pryže, t. zv. stability. Dřevěné špalíčky, dříve než jich používáme, vložíme do řídkého celloidinu, aby veškeré jejich póry vyplnil; jinak vidíme, když preparát přilepíme, že ze dřeva vystupuje mnoho vzduchových bublinek, preparát takto přilepený nepadá dostatečně k spodině, takže se při řezání lehce odloupne. Mnohem lépe se osvědčují nařezané špalíčky t. zv. stability, které jsou těžké a bez

pórů (lze je koupiti v obchodech s potřebami pro mikroskopii). Když přilepíme na ně preparát a vložíme je do alkoholu, klesnou na dno, kdežto dřevo plave na povrchu alkoholu. Často se stává, že preparáty na dřevěném špalíčku přilepené a nedostatečně ponořené obrátí se nahoru a vyschnou.

Velice nevhodné a nepraktické jest používání podložek korkových (zátek). Podklady korkové mají různé vady; leží-li na př. preparát na korku přilepený po delší dobu v lihu, extrahují se různé pryskyřičnaté a j. látky, líh hnědne a preparát taktéž se do hněda zabarvuje. Jiná obtíž nastává tím, že korek nasáklý lihem stává se velice poddajným, měkkým. Zapneme-li korkový podklad do svorky mikrotomu a utáhneme-li více šroub, zmáčkne se korek a preparát odlepi se od spodiny. Z těch a jiných ještě důvodů užíváme vždy podkladů pokud možná tvrdých a těžkých.

Pochod zalévání do celloidinu je tudíž tento:

1. Utvrzený preparát důkladně odvodníme v absolutním lihu;
2. uložíme do směsi alkoholu a aetheru;
3. přeneseme do řídkého celloidinu na 24 nebo více hodin, dle velikosti a složení preparátu;
4. přeneseme do poněkud koncentrovanějšího celloidinu;
5. vložíme preparát do hustého celloidinu. Tu možno preparát ponechat, aby zvolna se vypařil aether-alkohol, nebo přímo přilepíme na podklad.
6. Vložíme do 70% lihu, aby celloidin utvrdl. Po několika hodinách jest možno preparát řezati.

B. Methoda zalévání preparátů do paraffinu.

Methoda zalévání preparátů do paraffinu jest všestranně uznávána a to hlavně pro malé objekty. Hodí se nejlépe k hotovení seriových řezů ve všech odvětvích mikroskopie. Nejvíce se této metody používá v embryologii, kde dlužno hotoviti úplné serie. V histologii používá se metody paraffinové v těch případech, kde jde o řezy velice tenké; tam získáme z malých a vhodně připravených objektů řezy tloušťky až 1 μ .

Paraffin, jak v obchodě se dostává, jest látka průsvitná, nerozpouští se v alkoholu (jen ve 100 dílech vrou-

cího alkoholu rozpouští se as 3 díly paraffinu). Jest velice lehce rozpustný v sírouhlíku, v chloroformu, benzínu, xylolu, v různých olejích atd. Čistý paraffin taje mezi $40-62^{\circ}\text{C}$. Nutno věděti, na kterém stupni teploty taje paraffin, kterého chceme použiti.

Pro řezání nesmí býti objekt zaléván ani do příliš měkkého ani do zvláště tvrdého paraffinu. Jakého paraffinu dlužno použiti, závisí od samého objektu, který máme řezati, a od teploty místnosti, kde pracujeme. V létě jest záhodno užiti tvrdšího paraffinu než v zimě. Zdá se, že nejlepší paraffin jest ten, který se rozpouští při stupni as $52^{\circ}-54^{\circ}\text{C}$.

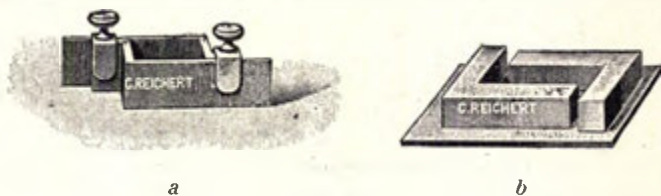
Preparáty, které mají býti v paraffin zality, musí býti naprosto bezvodé; musí projíti pozvolna alkoholem



Obr. 52.

vzestupně silným až absolutním. Poněvadž se však paraffin v alkoholu nerozpouští, jest nutno všecken alkohol odstraniti a použiti látek přechodných, ve kterých se paraffin rozpouští. Proto vkládáme preparáty z absolutního lihu do chloroformu, xylolu, terpentínového oleje, nebo benzolu. Není však radno preparát z absolutního lihu přenéstí bezprostředně do udaného prostředí, poněvadž při přenesení preparátu z lihu, na př. xylolu (nebo jiného prostředí), nastává velice rychle diffuse, která na jemnou tkáň (na př. embryonální) velice nepříznivě účinkuje, působíc trhliny ve tkáních, srašťování a j. Jest nutno tudíž počínati si takto: Užijeme-li za přechodné prostředí benzolu, tu připravíme si v jedné lahvičce směs 4 dílů abs. lihu a 1 dílu benzolu; do druhé lahvičky (se širokým hrdlem a skleněnou dobře zabroušenou zátkou) (obr. 52.) dáme 3 díly lihu a 2 díly benzolu, do třetí láhve dva díly alkoholu a 3 díly benzolu, do čtvrté 1 díl alkoholu a 4 díly benzolu a konečně do páté čistý benzol. Preparáty pak přenášíme opatrně z jedné nádobky do

druhé, malé po 20 minutách, velké po několika hodinách, až do čistého benzolu. Stejným způsobem si počínáme při xylolu nebo chloroformu a j. V tomto prostředí se stane preparát úplně průhledným. Z čistého prostředí nepřenášíme však rovněž preparát přímo do připraveného, horkem rozpuštěného paraffinu, nýbrž vložíme jej do benzolu, ve kterém rozpuštěn byl paraffin. Směs benzolu a paraffinu je tekutá již při velice nízké teplotě, a v ní necháme preparát pozvolna paraffinem projíti. Odtud teprve po nějaké době přeneseme preparát do horkého rozpuštěného paraffinu určité tvrdosti. V čistém paraffinu odpaří se teplem benzol, který se v preparátě nalézal. Zbyly-li by nějaké stopy benzolu (nebo xylolu, chloroformu atd.) v preparátě, bude při řezu paraffin v těch místech bílý, moučnatý, nedá se řezati, jen se drobí. Jest nutno



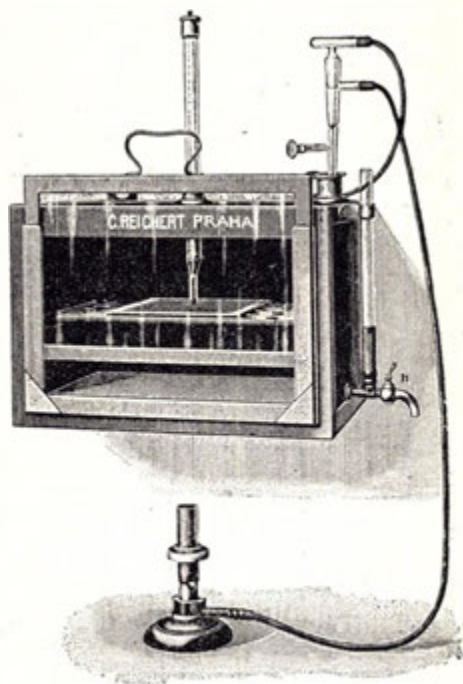
Obr. 53.

vložit preparát před konečným zalitím ještě jednou do úplně čistého paraffinu, kde po benzolu, xylolu atd. není ani stopy. Když soudíme, že preparát jest již úplně paraffinem prostoupen, vyjmeme jej a vložíme buď na hodinové sklíčko — je-li preparát tenký — nebo do větší a hlubší skleněné misky, kterou nutno dříve glycerinem lehounce potřít, aby ustydlý paraffin nelnul na sklo a mohl se snadněji z nádoby vyjmouti. Preparát v nádobce musí býti v paraffinu úplně ponořen. Aby rychleji ztuhl, vložíme nádobku do studené vody nebo ji obložíme ledem. Dokud paraffin jest tekutý, nesmí se voda dostat k paraffinu, ježto povstanou ihned prázdné dutinky kolem preparátu, voda jsouc těžší, vnikne mezi paraffin a zalití by nebylo úplně; když paraffin na povrchu poněkud ztuhl, možno nádobku pod vodu ponořiti. Když pak po nějaké době paraffin prostydl, ztuhl, tu vyjmeme jej z nádoby.

Kromě nádobek skleněných možno s výhodou použiti k zalévání preparátů do paraffinu dvou kovových nebo skleněných plotének stejně velkých, v pravém úhlu ohnu-

tých, které dle přiložení nám dají různě velkou „komůrku“ (obr. 53.). Ploténky utahujeme k sobě dvěma svorkami a stavíme je na skleněnou desku, která tvoří dno hračnolu (Reichert).

Dobře zalitý preparát v paraffinu musí býti stejnorodý, paraffin průsvitný. Při paraffinovém zalívání jde právě o to, aby nejen větší dutinky, ale i veškerá tkáň byla paraffinem prostoupena. Jak dlouho má zůstat preparát v paraffinu, nelze přesně určit; pro malé předměty stačí několik minut (tenké blány, retina, malá embrya ptačí atd.), jiné objekty je nutno ponechat v paraffinu hodinu i déle; o tom vždy možno jen evykem usouditi. Velké objekty nutno ponechat v tekutém paraffinu i více hodin při stejné teplotě. Aby paraffin zůstal po dlouhou dobu tekutým při stejné teplotě, nutno použití zvláště k tomu zhotovených vytápěcích komor paraffinových (obr. 54.). Jsou to thermostaty s dvojitou stěnou; mezistění jest naplněno vodou, která se zahřívá na určitou teplotu. Aby voda zůstala při stejné vysoké teplotě, používá se rtuťového thermoregulatoru, kterým prochází plyn. Jakmile dostoupila teplota určitého stupně, zamezí zařízení regulátoru větší přítok plynu, plamen se zmenší; ochladí-li se thermostat, klesne rtuť v regulátoru, čímž nastane větší přítok plynu a teplota se opět zvýší. Pro plynové topení vyhovuje nejlépe thermoregulátor Reichertův.



Obr. 54.

T. zv. neapolská vodní lázeň jest právě tak zařízena, jako obyčejný thermostat, a topí se malým Bunsenovým hořákem. V horní stěně nalézají se různě velké nádoby, ve kterých je rozpuštěný paraffin, různá prostředí a j. V principu zůstávají veškerá t. zv. paraffinová kamna stejná, a účelem jich jest jen udržeti stejnoměrnou teplotu.

Jest velice důležité, abychom si zapamatovali správně plochu preparátu, podle které máme vésti řezy. U některého materiálu jest to velmi snadné, avšak většina preparátů, hlavně malé, vyžaduje správnou orientaci. Ačkoliv paraffin jest dosti průsvitný, přece nemožno vidět detailů objektu. Proto nutno, dokud jest paraffin tekutý, postavit preparát jehlami tak, abychom měli správné vodítko, jak preparát musí býti připevněn, když v tom nebo onom směru jej chceme řezati. Pomáhá nám buď stěna nádoby, se kterou položíme preparát paralelně, nebo plocha, s již povrchem rovnoběžně budeme preparát řezati a pod. K tomu všemu třeba cviku. K snazšímu orientování jest zařízen přístroj, který skládá se ze skleněné desky, na které jest vyryta řada rovnoběžných, blízko sebe vedených rýh. Na desku tuto položíme dva skleněné úhly (obr. 53b.), které, přiloží-li se k sobě, utvoří nádobku. Do této nalijeme roztažený paraffin s objektem, který chceme řezati, a nahrátou jehlou položíme jej dle rýh. Po zchlazenutí paraffinu a sejmutí celého špalíčku máme na spodině otisk rýh, a s určitostí víme, v jakém směru k těmto rýhám jest objekt postaven.

Po ztuhnutí paraffinu přiřízne se tento do hranolu tak, aby kolem zalitého preparátu zůstala paraffinová vrstva v tloušťce 0.4—1 mm. Hranol přilepí se paraffinem na špalíček, který zapneme do mikrotomu; zevrubněji o tom viz: Řezání seriových řezů z paraffinu!

Brunk (Münch. Med. Wochenschrift 1905) užívá k zalévání do paraffinu a k rychlému hotovení paraffinových řezů acetonu, který má tu vlastnost, že se v něm materiál tak nesvraštuje, jako v alkoholu. Malé kousky materiálu vloží se do acetonu v láhvi, na jejímž dně leží vyžíhaná modrá skalice za účelem důkladného odvodnění.

Zde zůstanou kousky as 1 hodinu ležeti, přenesou se pak do xylolu, a až nabudou transparentního vzhledu, zalévají se do paraffinu.

Silsen (Zentralbl. f. allg. Path. und path. Anat.) podává tyto zkušenosti po acetonu: 1. Jako konservační

tekutiny k rychlému zalití do paraffinu možno použití acetonu jen pro orientaci. 2. Máme-li studovati detaily, je nutno před acetonem materiál fixovati methodami jinými, nejlépe formolem. 3. V chromových solích tvrzený materiál nutno dobře vyprati. 4. Po fixování a utvrzení v různých tekutinách fixačních jest možno používati acetonu k zalévání, hlavně za příčinou zjednodušení práce.

Zaliti preparátů do celloidin-paraffinu.

V mnohých případech docílíme velice pěkných výsledků, hlavně při materiálu velice tvrdém, kombinační methodou:

I. Dobře odvodněný preparát vložíme na několik hodin do směsi stejných dílů alkohol-xytolu.

II. Vysušené kousky celloidinu necháme projít toluolem, potom se celloidin vloží do směsi toluol-alkoholové (celloidin nesmí se toluolem sraziti). Roztok celloidinu musí míti syrovou hustotu.

III. V toluol-alk.-celloidinu rozpustí se pozvolna malé kousky paraffinu (možno málo nahřáti, aby se paraffin rychleji rozpustil). Směs celloidinu a paraffinu má býti při obyčejné teplotě pokoje tak hustá, jak paraffin. Do této směsi uloží se preparát.

IV. a) Nyní se přenese objekt s malým obalem této tekutiny do paraffinu s toluolem, potom do čistého paraffinu a zaleje se jak u paraffinu udáno; nebo

b) vložíme objekt do malé nádoby s celloidinem a paraffinem, aby se preparát přikryl; při nízké teplotě přidáváme pozvolna paraffin tak dlouho, až nádoba obsahuje téměř čistý paraffin. Další postup zalívání jest stejný jako při obyčejném paraffinu. Preparát se řeže napříč postaveným nožem.

Methoda ta jest doporučena Fieldem a Martinem pro tvrdé preparáty (hmyz s chitinem a pod.). Řezy lepší se hned na tekutinu Schällibaumovu, nebo na bílek; paraffin rozpustí se chloroformem.

Bumpus tvrdí celloidinové bloky v chloroformu; potom je naloží do oleje thymiánového. Preparát se úplně prosvítí, čímž dána možnost kontrolovati směr, ve kterém preparát chceme řezati. Při řezání těchto preparátů natírá se nůž thymiánovým olejem. Řezy nevysychají na podložním skélku. Olej se odstraní ssacím papírem, nechá

se as 15 minut odpařiti a přikryje se pak ihned kanad. balsámem. Místo thymiánového oleje možno použiti též oleje cedrového nebo směsi karbol. kyseliny, bergamotového a cedrového oleje nebo konečně i glycerinu.

Peterfi T.: Celloidin-paraffinové zalévání s řebíčkovým olejem nebo Methyl-benzoatcelloidinem.

Objekty z 95%ního neb absolutního alkoholu vložíme do 1%ního řebíčkového oleje, nebo do methylbenzoatcelloidinového roztoku (1 g suchého celloidinu ve 100 dílech řebíčkového oleje, nebo 2% celloidinového roztoku v alkohol-aetheru ve stejných dílech jednoho z olejů). V methylbenz. se rychleji celloidin rozpouští, jinak není rozdíl. Zde zůstanou tak dlouho (dle velikosti) až se stanou úplně průsvitné (24 hod. i více dnů), což jest důkazem, že jsou prostouplé.

Převедou se přes xylol, benzol nebo chloroform obvyklým způsobem do paraffinu. Řeže se jak obvyčejně. V pásčích 3—15 μ řezy se netrhají a nesvrašťují.

Wassermann F. (Z. f. wiss. Mikroskopie 1921, Bd. 38).

Celloidin-paraffinové zalévání malých objektů.

Autor udává metodu pro malé objekty (Rotatoria), kde celou řadu těchto tvorů zalévá najednou a tak k řezu připravuje. Malou komůrku skleněnou, as 4 mm v průměru, na jedné straně rovně přibroušenou, nahřeje, potře rovnou stranu paraffinem a přitlačí na podložní skélko a ještě zvenčí ji utěsní nanešeným paraffinem. Do této komůrky přenese (širší pipetou) tvrzený a v alkohol-aetheru uložený materiál, tekutinu odssaje úzkou pipetou (do které by nevníkl materiál) a to tolik, aby pouze nepatrné množství alkohol-aetheru tam zůstalo, načež ihned do komůrky pipetou vnese as 3%ní celloidinový roztok. Celloidin nechá pomalu vypařiti (nejlépe v nějaké nádobce, kde zvednutím víčka nechá celloidin pomalu vysychati).

Když se celloidin as do poloviny vypařil a zhoustl, vloží komůrku do nádoby s chloroform. parami. Těmito utvrdí se celloidin, při čemž rozpustí se paraffin, kterým byla komůrka upevněna. Když celloidin ztuhl, vloží celý celloidinový váleček do paraffinu. Po ztuhnutí téhož řeže jako paraffinový preparát.

IX. Hotovení řezů.

Hotovení jednotlivých řezů z celloidinu.

Preparát dobře v celloidinu zalitý, utvrdlý a uložený v 70% lihu, přirůzneme v hranol s rovnoběžnými stěnami, a to tak, aby kol preparátu zbylo něco celloidinu. Špalíček takto přirůznutý vložíme na nějakou dobu, asi 5 minut, do 96% lihu, nato jej ponoříme do aetheru, aby se povrchová vrstva poněkud rozpustila, hlavně na straně, kterou chceme připevniti k podložce. Namočíme špalíček do hustšího celloidinu a rychle jej přiložíme na podložku (dřevěnou, nebo lépe stabilitovou). Přilepený preparát necháme as 10 minut na vzduchu, až celloidin poněkud ztuhne; potom celý preparát na podložce vložíme do 70% lihu, kde jej necháme po několik hodin. Teprve potom preparát zapneme do svorky mikrotomu. Nůž jest zasazen tak, aby tvořil ostrý úhel k dlouhé ose mikrotomu. Čím je nůž podélněji položen, tím tenších řezů možno docíliti. Nůž nesmí se stavěti napříč, totiž kolmo proti preparátu.

K řezání připravíme si lahvičku s alkoholem, ve kterém namáčíme větší vlasový štětec, kterým pak natíráme nůž. Při řezání musí být nůž vždy dobře alkoholem potřený, rovněž i preparát natíráme alkoholem; činíme tak po každém tahu nožem. Řezy sejmeme s nože týmž štětcem a vkládáme je do misky s alkoholem. Pracujeme-li mikrotomem bez automatického posunování preparátu (na př. obyčejným Schanzovým mikrotomem), tu levou rukou posunujeme ozubené kolečko o určitý počet zoubků a pravou nožem preparát seřizujeme. Musíme hleděti, aby byly řezy co nejtenší (při celloidinu, jak zkušenost učí, nedosáhneme tenších řezů než 7 μ , a to jen tehdy, je-li jak preparát, tak zalití, jakož i nůž a mikrotom bezvadný). Mnohdy se stává, že se řezy při řezání zavínají a nemožno je později bez porušení narovnat. V takovém případě počínáme opatrně řezati; jakmile nůž zajel do kraje preparátu, ustaneme a štětcem na noži rozprostřeme a narovnáme stočený celloidin s preparátem. Je-li natažen,

jedeme nožem dále celým preparátem. Cvikem se naučíme tuto potřebnou proceduru lehce a jistě prováděti. Řezy se stáčí, byl-li celloidin kol preparátu příliš tvrdý; proto mnohdy prospěje, vložíme-li celý preparát na hodinu nebo déle do silného lihu, kde celloidin poněkud změkne. Někdy jest nutno nůž postaviti kolměji, jindy opět šikměji, o čemž jen delším cvikem možno usouditi, neboť nedá se předem říci, jak si máme počínati.

Vady při řezích v celloidinu:

Celloidin jest příliš tvrdý; tuto vadu odstraníme, když vložíme jej do silného alkoholu.

Někdy vidíme, že vlastní preparát se neseřízne hladce, nýbrž se drtí, plocha jeho jest drsná, vazivo vystupuje nad povrch. Vada tato jest velice častá a spočívá v tom, že preparát nebyl řádně celloidinem proniknut. Bývá to následek buď špatného odvodnění (dříve než jsme preparát vložili do slabého celloidinu), nebo nedostatečně dlouhé doby při zalívání. Stlačíme-li se stran takový preparát, vidíme, že vlastní preparát vystupuje do výšky a že z něho vytlačujeme alkohol. Této vadě nelze jinak odpomoci, než preparát znovu zalíti. V tom případě odstraníme nejdříve ve směsi aetheru a alkoholu celloidin, nato uložíme preparát do absol. lihu a počneme znovu celý pochod zalití. Velmi často nalezneme tuto vadu při řezech kůže, a všude tam, kde pracujeme s orgány obsahujícími mnoho tuhého vaziva.

Někdy větší dutiny uvnitř preparátu nejsou celloidinem vyplněny. Prostoupí-li dobře řídký celloidin, tu možno řezy zhotoviti, poněvadž řídký celloidin usadil se na stěně dutiny a není ani třeba, aby celá dutina byla vyplněna. Vadu tu odstraníme tak, že nakapeme nejdříve směs alkoholu a aetheru do dutiny, nato vkápneme do této kapky hustý celloidin a necháme jej zasehnouti. Nepodaří-li se nám takto vadu odstraniti, jest nutno preparát znovu zalíti.

Někdy přes dobré zalití vidíme, že se preparát při řezání drobí, takže nemůžeme obdržeti celý řez. To stává se po některých fixacích, nejčastěji po kyselině osmičelé neb po chromových solích. V takovém případě připravíme si velice řídký roztok celloidinu, kterým řeznou plochu preparátu, po řezu osušenou, štětečkem přejedeme, necháme málo oschnouti a dále řezeme.

Jiná vada záleží v tom, že celloidin jest příliš měkký. Napravíme ji tím, že vložíme celý preparát do slabšího, as 60% lihu, do glycerinu nebo do chloroformu. V těchto tekutinách celloidin náležitě ztverdne, ale jen tehdy, byl-li úplně čistý před upotřebením.

Celloidin, který byl po delší dobu používán k zalévání preparátů nedostatečně odvodněných, a do kterého následkem této chyby dostala se voda, stává se nepotřebným. Takový roztok celloidinu ihned poznáme dle rosolovatého vzhledu. Nahneme-li láhev, neteče stejnoměrně, nýbrž ve vločkách. Zalijeme-li preparát do takového celloidinu, nikdy nenabude tak stejnoměrné tvrdosti a zůstává ustavičně měkkým. V takovém případě nutno vylítí celou zásobu na plochou misku, celloidin necháme vyschnouti až do zrohovatění a znovu jej rozpustíme.

Jiná vada celloidinu, které nelze odstraniti, jest tato: Ukládáme-li do téhož celloidinu preparáty, které obsahují mnoho tukového vaziva, extrahuje směs aetheru a alkoholu v celloidinu tento tuk a celloidin se kalí do mléčna. Upotřebíme-li tohoto celloidinu k zalití, stane se neprůhledným, jest bělavě šedý a netverdne. Tuku nelze z celloidinu odstraniti.

Správně utvrzený celloidin musí míti stejnou konsistenci, jest průsvitný (preparát v něm uložený musí býti dosti dobře viditelný), žlutavé barvy. Mnohdy odpaří se aether-láh z celloidinu, který máme v zásobě, a celloidin stal se úplně hustým; tu nutno jej znovu rozpustiti tak, že přilijeme aether. Téměř vždy však shledáme, že po nalití aetheru do celloidinu utvoří se bílé sraženiny; to dokazuje, že celloidin obsahuje mnoho aetheru a málo lihu. Přikapeme-li absolutní láh, rozpustí se ihned vločky a celloidin stane se průhledným.

Seriové řezy preparátů zalitých v celloidinu.

Seriovými řezy nazýváme soubor za sebou jdoucích řezů stejné tloušťky, tak kladené, jak byly odebírány s nože mikrotomu. Má-li býti serie úplná a správná, nesmí chyběti ni jediný řez, řezy nesmějí býti v pořadu přeházené a musí býti stejně tenké. Jak později ukážeme, jest to za dnešní doby velice nutná metoda ve všech oborech histologického badání, zvláště při vyšetřování embryologickém. Jest velice mnoho způsobů, jak zhotoviti serie

řezů celloidinových. Mám však za to, že bude nejlépe ze všech různých method uvéstí jen to, co po dlouhé zkušenosti jest možno za nejlepší uznati. Než přikročím k popisu, jak hotoviti serie, připomínám, že jest první povinností připraviti si úplně čistá podložní skélka, máme-li s jistotou methodu tuto prováděti. Na větší serie řezů užíváme podložních skel v rozměru 55×80 mm. V některých případech stačí ovšem skélka menšího formátu.

a) Větší počet skel podložních vložíme do vody s kyselinou solnou, kde je necháme as 6 hodin. Pak slejeme kyselinu, omyjeme skla čistou vodou, aby nezůstaly ni stopy po kyselině. Nato skélka ještě omyjeme alkoholem a čistým plátnem osušíme. Skélka neohmatáváme prsty, aby na nich nezůstala „mastnota“. Takto osušená skélka pečlivě chráníme před prachem.

b) Do láhve se širokým hrdlem připravíme si roztok celloidinu, velice řídký, asi na 100 ccm směsi aetheru a alkoholu dáme jeden gram celloidinu hustého. Čisté skélko uchopíme do levé ruky, držíme je palcem a ukazováčkem na hranách delší strany úplně vodorovně a polejeme připraveným řídkým roztokem. Když se celloidin rozlil po celém skélku, nahneme je k jednomu rohu a slejeme přebytký celloidin zpět do láhve. Skélko polité postavíme poněkud šikmo, podepřeme horní hranu, spodní hrana pak se postaví na filtrační papír, který vyssaje přebývající celloidin. Takto připravíme si větší počet skel a oschlá uschováme. Dlužno ovšem pamatovati, která strana celloidinem byla polita. Po oschnutí zůstane velice jemná vrstva celloidinu pevně adhaesující ke sklu.

c) Připravíme si větší, nepříliš hlubokou skleněnou misku, kterou přikryjeme jinou miskou, nebo skleněnou deskou. Nádobu musí býti v průměru aspoň dvakrát tak velká, jak velké jest podložní sklo, na které máme řezy nalepovati. Do této nádoby dáme menší skleněnou misku, jako podklad pro sklíčko podložní. Do velké misky nalijeme na dno libovolné množství čistého aetheru, nejméně tolik, aby alespoň $\frac{1}{2}$ až 1 cm vysoko v nádobě se ho nalézalo; menší nádobka podložní musí býti ovšem vyšší než niveau aetheru. Nádobu dobře víkem neb sklem přikryjeme, aby páry aetherové neunikaly.

d) Dobře připravený a zalitý preparát zapneme do svorky mikrotomu a počneme řezati; nůž potíráme 96% alkoholem. Seříznutou část sejmemme opatrně malým vla-

sovým štětcem s nože a položíme na připravené podložní sklíčko, které bylo celloidinem polito (sub b), při čemž natřeme sklíčko silným alkoholem; další řez položíme vedle prvního atd. Když je první řada hotova, klademe řadu druhou v téže směru jako první; klademe tolik řad za sebou, kolik nám dovolí velikost krycího skélka. Abychom nemusili vždy zvláště rozměry krycího skélka odměřovati, vystříhneme si obdélník tenkého papíru velikosti krycího skélka a přilepíme jej zespoda na větší skleněnou desku. Na této desce pak leží podložní skélko, kterým nám zezdola prosvítá obdélník udávající rozlohu, kterou můžeme řezy pokrýti. Když je podložní sklo plné, urovnáme jednotlivé řezy do rovných řad, nahnutím skélka odstraníme přebytečný alkohol a skélko s řezy uložíme do připravené nádoby s aetherem tak, že položíme je vodorovně na podklad a přikryjeme. Páry aetherové vniknou ihned do alkoholu na řezech, při tom se rozpustí celloidin kol řezů a částečně také celloidin na sklíčku, vytvoří se jedna vrstva celloidinová, ve které řezy jsou uloženy. Řady musí zůstatí pohromadě. Jakmile se celloidin kol řezů stal průhledným, takže jednotlivé kontury celloidinového obalu se ztratily, pozvedneme víko a skélko opatrně z par aetherových vyjmeme. Ponecháme-li v nich skélko déle, tu rozejdou se jednotlivé řezy po skélku a nezachovají určitých řad. Cvikem naučíme se včas vyjmouti preparáty z par aetherových. Potom ponecháme po krátkou dobu skélko na vzduchu, aby rozpuštěný celloidin opět poněkud ztuhl. Jakmile se tak stalo, vložíme skélko do 80% lihu a řežeme serie další. Jednotlivá skélka poznačíme nejlépe *d i a m a n t o v o u t u ž k o u* běžnými číslicemi. V alkoholu zůstanou skélka libovolně dlouho. Zachováme-li všechna tato pravidla, pak možno s řezy jednou na skélku připevněnými provéstí další pochod barvení, odvodnění atd., až ke konečnému uložení do kanadského balsámu. Jedná-li se o řezání materiálu, který již byl předem v celku zbarven (viz barvení v celku!), jest další práce se seriemi velice snadná. Serie uložíme do 96% lihu, odtud přeneseme do oleje origanského (nesmí se používatí oleje hřebíčkového), pak do xylolu, nakapeme kanadský balsám, načež řezy přikryjeme krycími skly. Chceme-li řezy barviti na skle, tu přeneseme je nejdříve do destilované vody a odtud do barviva. Po obarvení je ve vodě opláchneme, pak vložíme je do alkoholu, který

nejméně dvakrát vyměníme, pak do oleje a přes xylol do balsámu. Barvení serií provádí se právě tak, jako jednotlivých řezů. (Viz barvení praeparátů!)

Vady vyskytující se při této metodě jsou tyto:

1. Celloidin kolem řezů zakalí se do běla, když vložíme je do aetherových par. Tuto vadu odstraníme obyčejně několika kapkami silného alkoholu, který nakapeme na řezy.

2. Řezy se rozbíhají po skélku. Příčinou toho jest nejčastěji množství alkoholu na skélku; nejlépe jest vymouti serii z aetheru a štětcem, nebo ssacím papírem odstraniti přebytečnou část alkoholu, a znovu uložit je do „aetherové komory“.

3. Někdy celá serie řezů po vložení do vody se zvedne od skélka a plave na vodě jako tenounká blanka; chyba spočívá v tom, že nebylo dobře vyčištěno podložní sklo. V takovém případě vezmeme nové čisté sklo, vložíme je opatrně do vody pod plovoucí serii a jednu stranu skélka pozvedneme do výšky z vody, při čemž současně přidržíme štětcem blanku ke skélku. Pomalu vyzvedneme celé skélko, na kterém se nalézají serie. Nyní odstraníme úplně vodu z blanky celloidinové a řezů tak, že nakapeme na ně silný alkohol, načež vložíme opět celé skélko do komory aetherové, kde se celloidin rozpustí a řezy ke sklu přilnou. Někdy se zvedne jeden nebo více řezů jednotlivých. Tu dlužno řezy položit opět na jejich místa a kapkou aetheru nebo kapkou řídkého celloidinu opět je připevniti. Jest samozřejmo, že nutno vodu se skla i s praeparátů opět alkoholem odstraniti. Nacvičíme-li celou metodu, velice zřídka serie odplavou.

Jsou ještě jiné metody, jak hotoviti serie řezů celloidinových, avšak všechny ostatní mají daleko více vad, než udaná metoda. Tak je na př. podobná metoda Weigertova; veškeré řezy kladou se nejdříve na papír (klosetový), pak přenesou se na skélko podložní, odstraní se veškerá voda a alkohol ssacím papírem, řezy polijí se řídkým celloidinem, který se nechá jen málo zaschnouti a vloží se do 70% lihu. Takto připravené serie přenesou se do vodných roztoků barviv. Při této metodě se celá celloidinová blanka od skla odloučí a řezy plovou na povrchu. Po zbarvení přenesou se do alkoholu a potom

papírem na sklo. Poté vloží se skélko do směsi xyلولu a karbol. kyseliny, do čistého xyلولu, nakape se kanadský balsám a řezy se přikryjí.

Lepení celloidinových řezů na bílek.

Čisté sklo natřeme bílkem (příprava bílku k lepení jest udána při paraffinu str. 117) a uložíme do thermostatu (asi 50° C), kde necháme bílek v teple sraziti. Takových sklíček můžeme si připravit mnoho najednou, jen jest nutno chrániti je před prachem. Jest možno též bílek sraziti nad plamenem, jen nutno dbáti, aby se bílek nespálil, což se stává velice lehce. Proto dlužno sklo držeti vysoko nad plamenem a pozorovati, kdy se začne bílek vypařovati. Po nějaké chvíli dáme sklo vychladnouti (bílek jest jistě koagulován).

Při řezání serií celloidinových klademe jeden řez podle druhého, při čemž na nich musí zůstati alkohol. Když sklo jest řezy pokryto, položíme na ně několikanásobnou vrstvu hladkého filtračního papíru, který důkladně přitiskneme tak, že levou rukou přidržíme papír ke sklu, pravou při náležitém tlaku přejíždíme po papíru. Tím přitisknou se všechny řezy důkladně na bílek a pevně přilnou. Nyní rychle odstraníme papír a přeneseme celé sklo s řezy do 80 % lihu. Po náležitém cviku velice zřídka řezy odplavou a možno je barviti různými methodami.

R u b a s c h k i n o v a methoda hotovení seriových řezů z celloidinu (Anat. Anz., Bd. XXXI. 907), zlepšená od **D a n t s c h a k o f f a** (Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie, Bd. XXV. 908):

Dobře zalité praeparáty v celloidinu řeží se mikrotomem v tloušťce 7—10 μ , namáčí se alkoholem 75%; vedle mikrotomu leží tmavá deska, na kterou kladou se objektní skélka, natřená bílkem. Řezy, které se na noži pečlivě narovnají, přenesou se na podložní skélko. Když je skélko plné, urovnají se — nesmějí ovšem mezi řezáním vyschnouti — a vysuší se několikrát přeloženým dobrým švédským ssacím papírem (papír nesmí pouštěti vláken.) Papír na řezy přiložíme a několikrát po sobě přejedeme přes něj rukou, dbajíce ovšem toho, abychom papírem při přetírání neposunuli. Tímto pochodem přitisknou se řezy na bílek a alkohol se odssaje. Dříve, než

by mohly řezy vyschnouti — což poznáme dle zblednutí preparátu — nalijeme na ně anglický hřebíčkový olej. Rubaschkin používal směsi anilinového oleje s olejem hřebíčkovým. Asi po 5 minutách jsou řezy prosvíceny a téměř všechny celloidin rozpuštěn. Poté vloží se skélka do nádoby s absolutním alkoholem, ve kterém se zbytek celloidinu odstraní. Zůstane-li však ještě celloidin na řezech, vloží se celé skélko do směsi alkohol-aetherové, kde se zbytky celloidinu jistě rozpustí. Pak vloží se skélko do 75% alkoholu, do destilované vody, do barvy atd., aniž by řezy se skélka odplavaly. Metodu tuto možno ve většině případů s prospěchem upotřebiti.

Ol t přilepuje řezy z celloidinu na gelatinu, která se formolem stává nerozpustnou, následovně: Ve 100 g destilované vody rozpustí se 10 g gelatiny, do které dá se vaječný bílek; směs ta se sváří a filtruje. Do čistého filtrátu přidá se 10 cc 5% roztoku phenolu. Takto připravená phenol-gelatina uloží se do láhve se širokým hrdlem i lze ji po dlouhou dobu upotřebiti. Před upotřebením vyjme se malý kousek gelatiny nožem z lahvičky a rozetře se na podložním skélku, takže tvoří velice jemnou vrstvu, která ihned schne. Jest možno připravit si tak větší počet skel do zásoby. Celloidinové řezy urovnají se na připravené skélko, přebývající tekutina se filtračním papírem vyssaje. Nenarovná-li se některý řez, pokape se znova alkoholem, srovná se a přitisknutím ssacího papíru opět se alkohol odstraní. Na takto vysušené a urovnané řezy přiloží se pásek papíru, který byl smočen v 10% formolu a přitiskne se jiným podložním skélkem. Po několika vteřinách jsou řezy úplně přilepeny a jest možno je přenést do různých tekutin. Pro úplnou jistotu přilepení dají se řezy do nádobky s 10% formolem, kde ponechají se as 1 hodinu i déle. Celloidin možno později aether-alkoholem úplně odstraniti. Je-li vrstva gelatiny jen nepatrná, pak nikterak neruší při jakémkoliv barvení.

Příprava k řezání z paraffinu.

Dobře zalitý objekt v paraffinu musí vrstvou tohoto prosvítati, paraffin nesmí býti moučnatě bílý, což se stává, jak již dříve uvedeno, buď tím, že v paraffinu zůstal benzol, xylol neb chloroform, v němž byl preparát projasněn, nebo tím, že bylo užito k zalití chladnoucího

paraffinu. Jest dobře před zalitím paraffin raději poněkud přehřátí.

Po řádném ztuhnutí preparátu ořežeme veškerý přebytkový paraffin, a to tolik, aby paraffin objímal objekt v tloušťce as $\frac{1}{2}$ —1 mm. Paraffin přirůzneme do formy špalíčku o poněkud širší basi.

Tak připravený paraffinový hranol přilepíme na stabilit nebo na špalíček dřevěný nebo kovový — dle různých mikrotomů — a to tak, že špalíček paraffinu uchopíme do pincety, ohrátou lžičkou (lopatickou) přejedeme jeho spodní plochu a přitiskneme na podložku (dřevo, stabilit atd.), na kterou jsme dříve nakapali trochu paraffinu a rovněž přejitím horké lopaticky rozpustili. Paraffinový špalíček ihned k podložce přilne. Aby lépe ztuhl, ponoříme podložku s preparátem do studené vody.

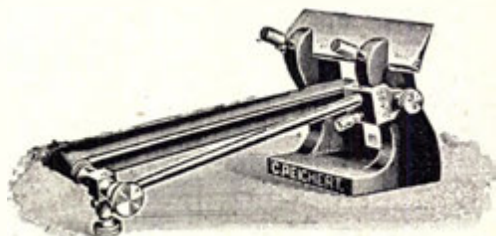
Po ztuhnutí přireže se paraffin kolem preparátu tak, aby byly strany hranolu úplně rovnoběžné, ke kterémuž účelu jsou při mikrotomech zařízeny zvláštní přístroje; možno přirézávati přímo na mikrotomu, jako u systému Rocking-Reichert, nebo na zvláštním přístroji, kde se paraffin přirézává širším nožem dle dvou vedoucích válečků. Podložka s objektem nasedá na tenký váleček, který se vsune do rourky, vedené kolmo k centru větší kulaté destičky, na které jest poznačeno rozdělení a kterou možno kolem osy otáčeti. Šroubem upevní se podložka. Preparát posunujeme šroubem dopředu a nazpět ke dvěma paralelním kolmým válečkům, ke kterým přikládáme nůž a paraffin podle nich seřezáváme. Činíme tak pomalu až do žádané vzdálenosti, kdy paraffinem prosvítá preparát. Nyní, aniž bychom preparátem pohnuli, otočíme destičku o 90° a přirézáváme opět. Tak pokračujeme na všech čtyřech stranách. Tímto strojkem obdržíme přesný hranol, což jest velice důležité při řezání seriových řezů, jak níže uvádíme.

Materiál v paraffinu zalitý řežeme tak, že nůž upevníme na mikrotomu ve směru příčném, na rozdíl od řezání v celloidinu, kde nůž řeže celou svou délkou. U paraffinu pouze jedním místem se paraffin prosekává. U většiny mikrotomů, zařízených pro paraffinové řezy, má nůž stálou polohu, takže nemůže býti ani jinak postaven. Řeže se za sucha. Podložku s preparátem připevníme na mikrotomu tak, aby ostří nože stálo úplně paralelně s hranou příříznutého paraffinu. Při seříznutí řez zůstane

lehounce na noži lpěti; při seříznutí druhého řezu pozorujeme, že se první řez posunul vpřed a že slepily se hrany obou řezů, což se při dalším řezání opakuje. Shledáme, že možno jehlou nadzvednouti od nože celou pásku k sobě lnoucích řezů. Při některých mikrotomech jest zařízení pro řezy takové, že se k noži připevní pásek z látky zhotovený, který spočívá na dvou otáčejících se válečcích (obr. 55.). Při řezání prodlužuje se pásek řezů, který s nože přejde až na pás pod nožem tím způsobem, že pozvolna pásem otáčíme, při čemž řezy neustále se posunují.

Paraffinové pásy řezou se jen tehdy, není-li zalitý materiál příliš tvrdý; rovněž tak paraffin nesmí býti příliš tvrdý. V tomto případě řezy se k sobě nelepí.

Jedná-li se o to, aby materiál řezal se v páscích, jest radno plochu paraffinu k noži obrácenou po příříznutí



Obr. 55.

potáhnouti silně ohřátým paraffinem, tajícím při nízké teplotě. Tohoto paraffinu ponecháme jen docela tenkou vrstvu na preparátě. Při řezání pak lnou řezy velice dobře k sobě.

Velké kousky materiálu dají se taktéž v paraffinu řezati, přihlížíme-li k tomu, v jakém směru zapnouti nůž, zda příčně neb podélně, jako pro celloidin. Jde-li o materiál, který neobsahuje mnoho tuhého vaziva po případě chrupavky atd., tudíž materiál měkký, tu možno řezati nožem příčným. Jinak však jest radno velké kousky v paraffinu zalité řezati nožem podélně postaveným, není-li ovšem mikrotom již předem zařízen pro velké řezy (na př. celým mozem).

Vady, které se u řezání v paraffinu vyskytují, jsou velice různé. Řezy se někdy úplně svinou a je tudíž nemožno dostati rovných řezů. Příčina leží většinou v tvrdém paraffinu; je-li v místnosti, kde se paraffin

řeže, chladno, stává se paraffin tvrdším a řezy se zaví-
nují. Odpomoc záleží ve zvýšení vùkolní teploty, aby
paraffin se poněkud ohřál a byl měkký.

Řezy se svařují, slepují dohromady a přilnou k noži,
takže nemožno jich s nože sejmuti. Příčina záleží v tom,
že paraffin jest příliš měkký, takže taje při nízkém stupni,
nebo že vùkolní teplota jest příliš vysoká. Stává se
velice často v teplých letních dnech, že vùbec nemožno
v paraffinu řezati.

Řezy jdou velice pěkně v pásku za sebou, jsou však
po délce přerézány; mnohdy vykazují více rýh vedle sebe
položených. To stává se jednak tehdy, když nůž není
naprosto čistě vybroušen, když má t. zv. jehlu. Velice
často leží příčina „škrabání“ řezů v tom, že na noži —
hlavně na jeho spodní ploše — zůstávají velice nepatrné
částičky paraffinu z kraje preparátu odloupaného, které
v tom okamžiku, kdy sjíždí ostří nože po preparátu, tento
poškozují. Proto jest nutno, abychom vždy po nějakém
počtu řezů ostří nože očistili, vždy však očistili, jakmile
se počne první řez přerézávati. Nůž očistí se ovšem na
mikrotomu, aniž bychom něčím pohnuli tak, že čistou
jemnou látkou přejedeme nůž od hřbetu k ostří.

Při řezání drobí se paraffin, ježto nesouvisí s prepa-
rátem; příčinou toho bývá špatné zalití. V paraffinu zůstal
benzol nebo jiná látka, ve které byl preparát prosvětlo-
ván, nebo bylo použito chladnoucího paraffinu. V tako-
vém případě jest nejlépe zalíti praeparát znovu do čistého
paraffinu.

Různé jiné vady, vyskytující se při řezání, naučíme
se cvikem rychle rozpoznávati a je odstraniti. Velice často
není možno docíliti dobrých řezů, a jen malé zvýšení
vùkolní teploty, jako rozsvícení lampy poblíž mikrotomu,
stačí, že docílíme velice pěkných řezů nebo celých pásků.
Totéž se jindy opakuje snížením teploty, na př. zavede-
ním jen zcela nepatrného průvanu.

Paraffinové zalévání hodí se v první řadě pro ma-
teriál embryologický, dále pro tkaně, které jsou stejné
konsistence, jako: játra, plíce, různé žlázy atd. Obtížné
jest zalíti a řezání kůže v paraffinu. Chrupavka, odvápně-
ná kost a podobné, vylučují téměř možnost dobrého
výsledku při této methodě.

Lepení paraffinových řezů na skélko podložní.

Mnoho preparátů, které se podrobují histologickému vyšetření v tenkých řezích, je tak z tkaniva složeno, že jednotlivé elementy jen nepatrně vespolek souvisí, a řez takový rozpadne se v malé kousky. Za tím účelem jest nutno, jak již při zalívání preparátu uvedeno, takový materiál nechat prostoupiti jinou látkou, která elementy pohromadě drží, ale jen na tak dlouhou dobu, dokud látka ta v řezu se nalézá, jako na př. paraffinem. Nemožno však paraffin při vyšetřování v preparátě ponehati; odstraní se xylolem, terpentínovým olejem a pod. Řez takový by se však ihned rozpadl. Tomu hledí se odpomoci tak, že řez přilepí se na podložní skélko již tehdy, kdy jest ještě paraffinem pohromadě držán. Jest mnoho různých method, jak to učiniti. Dlužno však bráti zřetel k tomu, zda jde o materiál, který byl v celku probarven, nebo o materiál, kde dlužno barviti teprve řezy.

a) Nalepování paraffinových řezů již předem obarvených.

V tomto případě jest celý postup nalepování dosti jednoduchý. Methoda Schälllibaumova (Arch. f. mikroskop. Anat., Bd. XXII. 1883). Připravíme si směs 1 dílu kollodia, 3—4 dílů čistého řebíčkového oleje. V lahvičce směs důkladně protřepeme a necháme ustáti. Štětečkem neb skleněnou tyčinkou nanese malou kapku směsi na skélko a rozetřeme ji nejlépe čistým prstem po jeho ploše. Rovné (ne stočené) paraffinové řezy klademe na toto skélko. Aby se řezy úplně narovnaly, položíme sklo podložní na skleněnou desku, ležící nad vodní lázní, která jest asi na 40° C ohřáta. Teplem rozehřeje se paraffin, řezy se poněkud vyrovnávají a zároveň odpaří se řebíčkový olej. Možno také řezy před ohříváním mírným tlakem ke sklu přitlačiti. Řezy takto nalepené zbavíme paraffinu tak, že vložíme je do xylolu nebo terpentínového oleje, aniž bychom se obávali, že se rozpadnou, a přikryjeme je kanadskou pryskyřicí.

Tento způsob jest velice dobrý a výhodný.

Strasser (Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskop. Bd. IV. 1887) udává podobnou směs, a to: 2 díly kollodia, 2 díly aetheru a 3 díly ricinového oleje. Práce jest táž, jako u metody Schälllibaumovy.

Giesbrecht. Metoda jeho spočívá v tom, že lepíme řezý roztokem šelaku. 5 g bílého šelaku (nebo žlutého) rozpustí se v 50 g absolutního lihu; roztok se filtruje. Štětečkem nebo silnější skleněnou tyčinkou přetře se celé podložní sklíčko. Uchlá vrstva šelaku natře se kreosotem. Řezý paraffinové kladou se na sklo a ponechají se as 20 minut na vodní lázni tak teplé, až se paraffin rozpustí. Po ochlazení rozpustí se a odstraní se paraffin v terpentínovém oleji (nesmí se užítí ani xylolu ani chloroformu, poněvadž by se šelak rozpustil). Preparát prikryjeme kanadským balsámem, který je taktéž rozpuštěn jen v terpentínovém oleji. Také jest možno řezý opatrně přitlačití na skélko (šelakem a kreosotem potřené) a uložití je as na $\frac{1}{2}$ minuty do par aetherových nebo chloroformových, kde šelak se poněkud rozpustí a řezý pevněji přilnou.

Gumový roztok dle Frenzla. K syru-pově husté a čisté arabské gumě přidá se málo chromového kamence, něco glycerinu a alkoholu. Skélko se natře touto směsí a na ně kladou se řezý suché, nebo v teplé vodě natažené. Sklíčko s řezý necháme as 20 minut na místě teplém 30—45° C; řezý přischnou, guma s kamen-cem se již nerozpustí. Takto přilepené řezý jest možno barvití i ve vodových barvách mimo fuchsin a safranin, neboť se jimi barví i podklad gummy.

Ještě jest více method, jako: gelatina-chromový ka-menec, guttapercha a j., jsou však všechny dosti obtížné a nedávají takových výsledků, jako právě udané.

b) Lepení řezů nebarvených.

Velice dobrá metoda, která se dá upotřebiti na řezý již předem barvené, hlavně však na takové, které se teprve po přilepení mají barvití, jest metoda lepení na bílek.

P. Mayer (Internat. Monatschr. f. Anat. Phys., IV. 1887).

Z několika vaječných bílků ušleháme sníh, který necháme nějakou dobu státí. Po ustání slejeme a smísíme asi 50 g tohoto bílku s 50 g glycerinu, k tomu přidáme trochu natrium salicylatu ve vodě rozpuštěného (jen do-cela málo, aby se netvořila plíseň). Směs nutno přefiltro-vati, což vyžaduje delší doby. Bílku možno po několik měsíců používatí. **Lee** přidá natr. salicyl. k bílku na sníh ušlehanému a zfiltrovanému a poté glycerin.

Na vyčištěném podložním skélku rozetřeme důkladně velice malou kapku bílku nejlépe prstem; můžeme dokonce bílek roztíratí nejdříve prvním, pak druhým a ještě i třetím čistým prstem, takže se zdá, že není již bílku na skle. Jest nutno, aby byla vrstvička jeho velice nepatrná, poněvadž by se později zbarvila a rušila dojem preparátů. Řezy paraffinové klademe jeden podle druhého; je-li objekt dobře zalit a vše dobře zřízeno, řezou se celé pásky paraffinové, které při sobě drží, a přeneseme pak na sklo celý pásek. Když je sklo plné (tolik, co pokryjeme skélkem krycím), nakapeme štětcem na sklo vedle řezů destilovanou vodu; tato vtáhne se pod řezy, které, jsou-li vhodně tenké, počnou se již nyní natahovati a narovnávatí. Vodu možno též dříve štětcem na skélko natřítí a teprve pak klásti na ni řezy. Jest úplně lhostejné, jak vodu přidáváme pod řezy; činíme tak, jak jsme navykli. Vody musí býti sdostatek a při tom hledíme, by se řezy nerozptýlily po celém skélku; není-li možno řezy staviti k sobě, nahneme pozvolna skélka na jednu stranu, aby voda otekla, a pak možno řezy k sobě jak náleží jehlou seřaditi. Potom položíme skélko opět do roviny vodorovné a vložíme je do thermostatu, nebo na teplou lázeň asi 45—50° C. Řezy se úplně narovnají, voda pomalu vysychá. Řezy takto přilepené jest nutno po několik hodin vysoušeti, nejlépe přes noc. Když veškeré řezy jsou úplně pevně přilepeny, odstraníme paraffin v xylolu, terpentinu nebo chloroformu. Nebarvená serie přeneseme se, aby odstranil se xylol, do alkoholu, který se dvakráte vymění; pak možno uložití řezy do vody a do barvy, aniž bychom se musili obávatí, že řezy odpadnou. Takto přilepené řezy možno barviti i odbarvovati všemi methodami. Způsob tento možno co nejlépe doporučiti na řezy jednotlivé i celé serie.

G a u k : Na dobře očištěné skélko dáme několik kapek 30% lihu, který se musí stejnoměrně po skélku rozprostřítí; na takto připravené podložní skélko klademe paraffinové řezy. Když máme určitý počet řezů na skle, necháme tekutinu pozvolna při nízké teplotě odpařiti. Za 24 hodiny řezy úplně adhaerují ke sklu a možno provésti na nich veškeré barvení i odbarvování, aniž se řezy od skla odloučí.

R a b l nalepuje methodou Schällibaumovou a tvrdí, že možno po přilepení kollodiem v řebíčkovém oleji veš-

keré pochody s řezy podniknouti, aniž řezy odplavou. Jest však rutno použití řebíčkového oleje úplně čerstvého, který nesmí na světle státi, a lepidlo musí se vždy čerstvě připravit, jinak řezy nedrží. Dle vlastní zkušenosti a dle udání Mayerova a j. není metoda ta spolehlivou.

Rychlá metoda bílková. Někdy jest dlužno přilepiti jen jednotlivé řezy. Tu počínáme si tak, že paraffinový řez, který nesmí býti stočený, nýbrž rovný, položíme na sklo natřené velice slabě bílkem a přitlačíme jej čistým prstem důkladně ke sklu za sucha, aniž jej položíme na vodu. Sklíčko s řezem nahřejeme, až se paraffin rozpustí (při tom koaguluje bílek, stává se nerozpustným), vložíme pak preparát do xylolu, dále do alkoholu, který se vymění, pak do vody a barviva, potom se odbarvuje, ve vodě opláchneme, v alkoholu odvodní a pak se přeneseme do xylolu a přikryje balsámem.

Michaelis (Pflüger's Archiv XCVII. 1903) udává tuto metodu pro lepení jednotlivých paraffinových řezů:

Řez paraffinový položí se do misky s vodou, která jest as na 45° C ohřáta; když se úplně narovná, vloží se podložní skélko pod tento řez a s ním z vody se vytáhne. Voda, která na skélku zbyla, odstraní se ssacím papírem. Pak vezme se proužek hladkého psacího papíru a přitlačí pevně na řez, který se od skélka zvedne a přilepí na papír. Přesahující papír kolem řezu se odstříhne, načež řez i s papírem přitiskne se na podložní skélko bílkem a glycerinem jemně natřené. Bílek musí však býti ohřátím skélka nad plamenem sražen. Přeneseli-li se nyní sklo i s papírem do xylolu, odpadne papír a úplně rovný řez drží na skle; pak možno preparát přenést do alkoholu, vody a do barvy.

Při lepení řezů na bílek jest dlužno dbáti toho, aby ani voda ani barviva, kterých používáme, neobsahovaly alkalií. Alkalické roztoky rozpouštějí bílek a řezy by ihned odplavaly; je tudíž nutno používati reagentií a barev buď čistě neutrálních nebo kyselých.

Jiný způsob, jak možno v paraffinu zhotovené řezy lehce narovnat a na podložní skélka nalepovati, je tento:

Dříve než počneme řezati, připravíme si destilovanou vodu ohřátou na nižší stupeň teploty než je bod tání paraffinu (as 42—45° C), kterou nalejeme na misku (nejlépe Petri-ho miska).

Řez sejmeme s nože a opatrně jej přeneseme jehlou na ohřátou vodu, kde se ihned narovná, byl-li stočen, eventuálně napomáháme jehlou řez roztáčet. Dlužno dbáti toho, aby řezná plocha, kterou poznáme dle lesku, byla položena na vodu. Stácejí-li se řezy, tu nutno přiložiti



Obr. 56.

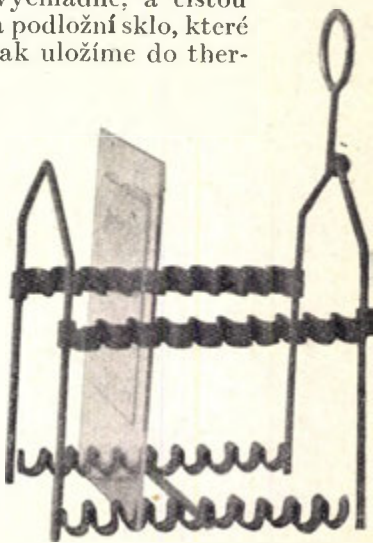
jehlu opatrně k řezu v té chvíli, kdy nůž počne preparát řezati, při čemž nesmíme přitlačiti jehlou řez pevně k noži, nýbrž jehla musí býti volně nad nožem držena v lehkém doteku k preparátu; takto se nejlépe

zamezí stáčení řezů. Dlužno dáti pozor, aby ostří nože nebylo jehlou poškozeno, což se velice často stává, než nabude se zručnosti v té práci.

K tomu účelu jsou pořízeny různě stavěné „natahovače“ řezů. (Obr. 56.)

Když máme již dostatečný počet řezů na vodě natažených, počkáme, až voda vychladne, a čistou lopatičkou přenášíme řezy na podložní sklo, které bylo bílkem natřeno, toto pak uložíme do thermostatu na tak dlouho, až voda vyschla. Zkušenost učí, že jest nejlépe řezy ponechat úplně po 24 hodin v sušárně, která jest nejvýše na 56° C vyhřátá. Takto přilepené řezy snesou bez porušení celou další manipulaci — odstranění paraffinu v xylolu, dále přenesení přes alkohol do vody a barvy, napotom přenesení přes alkohol do xylolu a přikrytí pryskyřicí.

Jde-li o seriové řezy celých embryí, kde serie čítá velký počet skel, tu zjednodušíme sobě velice práci s odstraněním paraf-



Obr. 57.

finu, přenášením do alkoholu vody a barvy, pak opět po obarvení přenášením do vody, alkoholu a xylolu tím způsobem, že používáme drátěných „košíčků“, do kterých vkládáme serie skel za sebou jdoucích, a celou manipulaci provádíme s více (obvykle 10) skélky najednou. (Obr. 57.)

Vady, vyskytující se při hotovení seriových řezů z paraffinu.

Přenesou-li se serie ze xylolu do alkoholu a potom do vody, povstává bílá sraženina na skle, což poukazuje na to, že v posledním xylolu nalézá se již mnoho rozpuštěného paraffinu nebo v alkoholu mnoho xylolu, který dává taktéž ve vodě sraženinu. Vadu tuto odstraníme vložением celé serie ještě jednou do čistého alkoholu a pak teprve do vody.

Někdy se stává, že částky řezu odplavou buď již v xylolu nebo v alkoholu. V takovém případě nebyl řez dostatečně přilepen k bílku. To stává se tehdy, když po uložení serie do termostatu zůstaly pod řezem bublinky vzduchu, takže na těch místech nepřilnul řez na bílek. Této vadě nelze později nijak odpomoci. Musíme dbáti toho, by bublinky vzduchové pod řezy nezůstávaly.

Stává se často, že řez na místě, kde byla vzduchová bublinka, není nikterak poškozen, avšak při barvení najdeme, že ono místočko se mnohem intenzivněji zbarvilo, než ostatní řez. Děje se to tím, že v těch místech tkáň více bobtná a přijímá více barviva. Místa taková, víme-li o této vadě, při studiu nikterak nevadí, kazí snad jen celkový dojem.

V některých případech se stává, že řezy vůbec nedrží a přijdou-li serie do vody nebo barvy, tu odplavou. V tom případě dlužno pomýšleť na to, že buď skla nebyla řádně vyčištěna, nebo reagencie, kterých bylo použito, po případě barviva, byla alkalická, a tím rozpuštěn byl bílek. Podložní skla, kterých se používá k lepení řezů bílkem, nutno čistiti kyselinami. Hodláme-li očistiti sklíčka, která byla bílkem natřena, tu nutno je nejdříve omýti v sodě, která bílek rozpouští, potom v okyselené vodě a nakonec v alkoholu.

Seriové řezy, které nelpí dobře na skle a lehce odplavou, možno zachrániti tím způsobem, že převede se serie paraffinová do slabého celloidinu. Jakmile se od-

straní z řezů paraffin — v té době řezy téměř nikdy, byť byly i slabě držány, neodplavou — ponoříme sklo se serií řezů do velice slabého roztoku celloidinu v alkohol-aetheru. Po vynětí držíme malou chvilku serii na vzduchu, až odkape přebytečný celloidin, načež vložíme skélko do slabého alkoholu, pak do vody; tímto způsobem zachrání se jistě celé serie. Při barvení se ovšem stává, že některá barviva obarví i celloidin.

IX. Barvení preparátů.

Zkoumáme-li živý materiál nezbarvený nebo nezbarvené řezy materiálu fixovaného, narážíme na velké obtíže při rozeznávání jednotlivých elementů. Až do let padesátých předešlého století dělo se histologické vyšetřování jen na nebarveném materiálu. Teprve Gerlach nahodile obdržel preparát mozku zbarvený karmínem. Zkoumaje totiž tkáň mozkovou, odkládal nepodařené řezy z volné ruky hotovené do nádoby s vodou, ve které nahodile byla zrnka karmínová, kterými se voda zbarvila. Druhého dne shledal, že řezy v nádobce uložené se zbarvily. Prohlížel řezy a shledal, že buňky gangliové se červeně zbarvily, při čemž intenzivněji byla zbarvena jejich jádra. Takto vznikl počátek barvení řezů, a tím nová epocha histologického vyšetřování. R. 1858 uveřejnil již Gerlach: „Mikroskopische Studien aus dem Gebiete der menschlichen Morphologie“ na základě preparátů barvených karmínem. V té době jiného barviva kromě karmínu se neužívalo. Různou fixací a různou přípravou preparátů nastala potřeba vyrobti různě kombinovaná barviva karmínová; tak byl karmín dle Freye, Beala, Thiersche a j. Roku 1865 objevil se haematoxylin kamencový dle údaje Boehmerova. Od té doby vznikly různé kombinace známých barev, jednak vynalézány byly barvy nové. Nová epocha v barvení histologických preparátů vznikla vynalezením barev dehtových — anilinových. R a n v i e r ve své histologii (1875) uvádí již některá barviva dehtová (fuchsin, chinolinovou modř, anilinovou modř), avšak tehdejší metoda barvení neodpovídá dnešnímu barvení barvami anilinovými, jak později uvedeme. Princip metody barvení dehtovými barvivy udal v r. 1875 H e r m a n n ; v jednotlivostech tuto metodu opracoval teprve F l e m i n g v r. 1881. Od této doby úžasně vzrostla literatura o barvení preparátů; sledujeme-li však toto moderní „barvičkování“, vidíme, že právě tak, jako vznikají z nesprávné metody fixace nesprávné dedukce o tkanivech, zavádí také barvení, není-li dostatek vlastní kritiky, n a

s čestí. Vyskytly se varovné hlasy (Nissel a j.) před ukvapenými dedukcemi, a jest nutno, aby také na poli barvení ještě velice mnoho a čistě vědecky se badalo.

Dosud není rozřešena otázka, jde-li při barvení, t. j. při vázání se barev k elementům, o pochod chemický či fysikální. Jsou dva tábory badatelů: E h r l i c h, M a y e r, B e n d a a j. jsou toho mínění, že jde o pochod chemický, naproti tomu G i e r k e, R a w i t z a zvláště F i s c h e r snaží se dokázati, že je to projev fysikální.

Zajímavým, možno říci psychickým projevem jest snaha každého začátečníka při histologické práci preparát co možná nejpestřeji zbarviti. — Pracuje-li déle, tu dochází k tomu přesvědčení, že čím jednodušší metoda, tím je lepší, a uvědomí si, že barvením chceme jen snadněji elementy differenceovati.

Při histologickém barvení rozeznáváme barvení d i f f u s n í a e l e k t i v n í. Prvního užijeme jen v nečetných případech, hlavně tehdy, jde-li na př. o to, aby dutiny v určitém orgánu lépe vynikly. Při barvení e l e k t i v n í m jen určité elementy barvivo přijmou, ostatní tkáň však zůstává téměř, nebo úplně nezbarvenou; na př. barvíme pouze jádra buněčná, nebo jen plasma buněk. Dále rozeznáváme barvení s p e c i f i c k é nebo h i s t o l o g i c k é, kdy jen určité elementy se zbarví, vše ostatní jest bezbarvé; na př. specifické zbarvení vláken nervových po zlatě a j.

Barvení p r o g r e s s i v n í nebo-li p ř í m é a barvení r e g r e s s i v n í, n e p ř í m é. V prvním případě barví se za určitou dobu, na př. jádra; ponecháme-li preparát déle v barvivu, zbarví se též jiné elementy. Barvení r e g r e s s i v n í vyžaduje d i f f u s n í h o z b a r v e n í celého preparátu a teprve potom vylučujeme odbarvováním preparátu přebytkovou barvu, která váže se jen na určité elementy; děje se tak na př. u většiny barev dehtových.

Methody barvení rozdělujeme ještě na barvení s u b s t a n t i v n í (samostatné) a a d j e k t i v n í (přídavné). V prvním případě stačí, vložíme-li preparáty do barviva a barvíme-li beze všech jiných příprav; u druhé metody jest zapotřebí preparát dříve připravití určitou látkou, t. zv. mořidlem, aby barvu přijal.

Po stránce praktické rozeznáváme barvení v c e l k u (v kuse) a barvení ř e z ů. Dále jest možné t. zv. bar-

vení dvojité, použijeme-li jednak barev elektivně barvicích jádra a jiné barvy, která váže se jen na plasma buněčné. Jakési dvojité barvení je též tam, kde nastává t. zv. *metachromasie*; při použití jedné barvy určité elementy zbarví se na př. modře, jiné zbarví se toutéž barvou červeně.

Na literaturu histologického barvení není nám možno zacházeti; uvádíme jen tolik, že barvení preparátů mikroskopických povstávalo jednak nahodile, zkusmo, bez předpokladů vědecky doložených, anebo bylo adaptováno z technického průmyslu barvířského, kde barví se určité látky, jako vlna, bavlna, hedvábí a kůže; z tohoto barvířství bylo hlavně adaptováno barvení adjektivní t. zv. *mořidly*. Pro histologa je nejdůležitějším to, že jsou vypracovány metody různého barvení; jak a odkud povstaly, náleží do jiné disciplíny.

O přípravě barviv. V dnešní době mnoho továren dodává veškerá barviva již hotová. Přece však možno doporučiti, aby si každý připravoval roztoky barev sám, a to nejen z důvodů úsporných, ale hlavně proto, že některá barviva konají dobrou službu jen tehdy, jsou-li úplně čerstvá, a tu nemožno se spolehnouti na barvivo z obchodu.

Jiná barviva jsou velice stálá a čím jsou starší, tím lépe barví; taková možno si připravit ve větším množství a jsou vždy po ruce. Ovšem příprava barviv vyžaduje čistých ingrediencí; o jakosti těchto přípravků možno se přesvědčiti a pracovník alespoň určitě ví, s jakými látkami pracuje. Na jakost barviva v obchodě vyrobeného nemožno se s určitostí spolehnouti, a mnohdy jen proto, že barvivo nebylo dobře připraveno, neobdržíme žádané čistoty při zbarvení preparátů. Rozhodným důvodem pro domácí přípravu barviv jest ovšem také úspora, neboť mnohé barvivo připravíme si tak lacino, že se to nedá ani srovnati s cenou v obchodě.

V následující stati uvádíme barviva v histologii všeobecně užívaná, jakož i bližší údaje o jejich přípravě. Barvení podle jistých předpisů prováděná, na př. metoda Weigertova na nervstvo, na gliová vlákna a j. v., uvedena jsou ve stati speciálních method.

Nejvíce užívaná jsou barviva, která obdržíme různými kombinacemi a přípravou z krystalů haematoxylinu.

Krystaly haematoxylinu jsou výtažky ze dřeva campechového. Dle P. Mayera jest v haematoxylinu obsažen haematein, který teprve ve styku se zemitými solemi nebo solemi některých kovů dává barvivo; haematoxylin čistý není tudíž barvivem. Veškeré t. zv. „haematoxyliny“ hned po přípravě nebarví; jest dlužno nechati je „uzrát“. „Zrání“ haematoxylinu vyžaduje dosti dlouhou dobu; v otevřené láhvi i několik týdnů. Haematoxylin z haemateinu připravený jest barvivo, kterým možno ihned barviti bez dalšího uzrání. V dnešní době obdržíme v obchodech krystaly haematoxylinu i haemateinu. K přípravě barev haematoxylinových jest nejlépe uchystati si roztok krystalů haematoxylinových v alkoholu v poměru 1 : 10; roztok tento dává barvu hněděčervenou, a jest možno si z něho připraviti barvivo s kamencem nebo zemitými solemi. Jiná vlastnost haematoxylinu je ta, že haematoxylinový roztok ve styku s některými solemi kovů, jako: železa, mědi a j., dává zvláštní „lak“, barevnou sůl. Basemi těchto kovů impregnuje se nejdříve preparát a teprve po této impregnaci vkládáme preparát do haematoxylinu, který v doteku se solí kovu tvoří lak. O metodě této viz níže.

Barviva haematoxylinová.

Původní barvení haematoxylinem dělo se takto: Na drobné kousky modrého dřeva (*Lignum campechianum*) v nádobě uložené nalil se nasycený roztok kamence. Po několika dnech i týdnech utvořil se extrakt barvy modrofialové, kterým se barvily preparáty. Výtažek dával dosti dobré výsledky, vadou jeho však bylo, že extrahován byl ze dřeva též tannin, který působil někdy velice škodlivě při barvení. Tomu odpomoženo později tím, že chemickou cestou byla extrahována látka účinná, která přichází do prodeje pod názvem haematoxylinu, a které se dnes jediné užívá.

Nejstarší předpis ku přípravě haematoxylinu jest Böhmerův. *Kamencový* haematoxylin (Böhmer 1865). 1 g kamence rozpustil se ve 240 ccm vody; na hodinové sklíčko nakapalo se několik kapek hnědého alkoholického výtažku dřeva campechového asi 1 : 12 abs. alkoholu. V pozdější době teprve udán předpis pod názvem Böhmerova haematoxylinu:

- | | | | |
|----|---|--------------------|--------|
| 1. | { | Haematoxyl. cryst. | 0·35 g |
| | | Alkohol abs. | 10— g |
| 2. | { | Kamenec dras. | 0·1 g |
| | | Voda dest. | 30— g |

Z roztoku 1. nakapeme několik kapek do roztoku kamence, necháme několik dnů na světle státi a tak obdržíme fialovou barvu, kterou před použitím ještě filtrujeme. Barví jádra buněčná hlavně po fixaci alkoholem nebo Müllerovou tekutinou. Byl-li preparát přebarven — totiž bylo-li vedle jader zbarveno též protoplasma nebo vazivo atd. — tu vymyjeme preparát v docela slabé kyselině octové, solné nebo pikrové, důkladně jej propeřeme v dest. vodě, odvodníme v alkoholu a přes olej přeneseme do kanady.

Kamencový haematoxylin (Frey):

- | | | | |
|----|---|--------------------|---------|
| a) | { | Haematoxyl. cryst. | 1 g |
| | | Alkohol abs. | 30 cc |
| b) | { | Kamenec dras. | 0·5—1 g |
| | | Voda dest. | 30 cc. |

Nakapeme několik kapek roztoku a) do roztoku b), až obdržíme fialovou barvu; směs nechá se státi na světle několik dnů, pak se filtruje. Preparáty jsou zbarveny po 5—30 minutách. Fixace preparátů děje se hlavně alkoholem, Müllerovou tekutinou a chromovými solemi, kys. octovou, formolem a sublimatem. Přebarvené preparáty možno odbarviti v roztoku kamence, v němž dlužno je po několik hodin ponechati; potom nutno preparáty důkladně ve vodě vyprati.

Kyselý haematoxylin kamencový (Ehrlich):

- | | |
|--------------------------------|--------|
| Haematoxyl. cryst. | 2 g |
| kys. octová ledová | 10 cc |
| glycerin | 100 cc |
| alkohol abs. | 100 cc |
| kamenec draselnatý v nadbytku. | |

Směs dlužno ponechati delší dobu na světle, až povstane krvavě červená tekutina (asi po 4 dnech). Tekutinu filtrujeme a v dobře uzavřené láhvi uschováme. Tento haematoxylin barví po nejružnějších fixacích v době několika minut.

H a e m a t o x y l i n - g l y c e r i n - k a m e n e c (D e l a f i e l d). Připravíme si nejdříve čistý alkoholický roztok haematoxylinu v krystalech: 4 g na 25 cc abs. lihu (doporučuje se mít tento roztok vždy v zásobě, jelikož se nekazí), a tento vlejeme do 400 cc nasyceného roztoku amoniakálního kamence (rozpuští se asi 1 : 11). Tuto směs roztoků ponecháme asi 4 dny v otevřené nádobě na světle, až obdržíme tmavě fialové barvivo, které sfiltrujeme a přidáme k němu 100 g čistého glycerinu a 100 g methylového alkoholu. Potom opět filtrujeme. Barvivo takto připravené necháme v otevřené láhvi na světle státi (i 2 měsíce), až jest úplně tmavé. Při barvení nutno tento haematoxylin dosti rozřediti; barví velice rychle a elektivně.

B ü t s c h l i doporučuje D e l a f i e l d ů v haematoxylin rozřediti takovým množstvím kyseliny octové, až modrá barva změní se na červenou; toto barvivo barví ještě ostřeji jádra než předešlé.

Doporučuje se preparáty, barvené kyselými roztoky haematoxylinovými, vyprati v obyčejné vodě, která slabě alkalicky reaguje; tím nabudou pěkné modré barvy.

C a r a z z i (Z. f. w. M. 1911) Jodkalium-jod-haematoxylin. Barvu připravíme takto: Rozpuští se

| | |
|----------------------|----------|
| Haematoxilini cryst. | 0.5 g |
| Kalii jodati | 0.01 g |
| Alum. crud. | 25.0 g |
| Glycerini | 100 ccm |
| Aq. dest. | 400 ccm. |

Po 2 hodinách jest haematoxylin schopný barvení. Barvení jest trvalé, nevybledne jako ostatní haematoxylinem zbarvené preparáty, na nichž hlavně periferie řezu pod skélkem bledne.

Haemacalcium P. M a y e r :

| | |
|-------------------|---------|
| Haematein | 1 g |
| Chloraluminium | 1 g |
| Chlorealcium | 50 g |
| Acid. acet. glac. | 10 cc |
| Alkohol 70% | 600 cc. |

Nejprve rozetřeme jemně haematein s chloralumi-
niem a rozpustíme jej v kys. octové a alkoholu buď za

tepla nebo za studena, a nakonec přidáme chlorcalcium. Barvivo jest červeně fialové. Barví-li se řezy příliš červeně, pak vymyjí se ve 20 % roztoku chloraluminia v alkoholu. Obvykle však dostačí vyprání v neutrálním alkoholu. Dle zkušeností nebarví tak elektivně, jako vodné roztoky haematoxylinu.

Z uvedených předpisů pro zhotovení barev z krystalů haematoxylinových vidno, že veškeré tyto barvy potřebují určité doby, aby uzrály, jinak nebarví.

Již roku 1842 Erdmann (Journal f. prakt. Chemie XXVI. a. l. c. 1858 LXXV.) vyrobil první chemicky čistý haematein a dokázal, že barvicí schopnost haematoxylinu přináleží právě haemateinu; haematoxylin barví jen tehdy, převedeme-li jej oxydací v haematein. Z uvedených příkladů, jak připravit různé haematoxyliny, jest právě viděti snahu oxydací haematoxylinu převésti tento na haematein; k pochodu tomu za obvyčejné přípravy kamencovými solemi je třeba delší doby. Hensen správně upozorňuje na to, aby každý, kdo s haematoxylinem pracuje, seznámil se nejdříve důkladně s literaturou o haematoxylinu, jmenovitě s prací Erdmannovou, aby „zbytečných objevů“ ubylo. Nemožno nám zde zacházeti na tuto literaturu, odkazujeme jen na práci Hensenovu, kde jest celá literatura snesena; on sám pak ujal se vděčné práce o haematoxylinu a haemateinu, ale hlavně o železitém chromhaemateinu. Po důkladném chemickém prostudování dochází k závěrům, ze kterých vyšla udání o železitých a chromokamencových haemateinech, doporučujících se co nejlépe; barví bez dlouhotrvajícího zrání. Poukazujeme jen k tomu, že příprava těchto haemateinů vyžaduje naprostou přesnost, chceme-li obdržeti trvanlivé barvivo.

Z různých předpisů uvedeme jen přípravu železitého a chromokamencového haemateinu, se kterými úplně vystačíme.

I. Železitý haematein Hensen.

1. 10 g čistého železitého kamence (Ferriammoniumsulphat) rozpustí se ve 150 g dest. vody za tepla.

2. 1·6 g haematoxylinových krystalů rozpustí se za tepla v 75 g destilované vody.

Oba roztoky musí vychladnouti, načež se smísí tak, že přidáváme po kapkách roztok železitého kamence do

haematoxylinu za stálého míchání. Okysličování probíhá za studena velice zvolna. Obdržíme nejdříve směs roztoků, jejíž barva jest nejdříve hnědá, poté modrá a konečně tmavě fialová. Směs pomalu zahříváme až na bod varu, kdy reakce rychle postupuje. Ohřívání provádíme nejlépe ve skleněné baňce. Směs neponecháme déle ve varu než $\frac{1}{2}$ —1 minutu. Když vychladne, přidáme k ní 1·40 g amoniumsulphatu. Barva musí býti tmavohnědá a roztok musí kyselé reagovati. Nepatrné množství sraženiny — tvořící se i později — jest nutno v láhvi ponechati. V řezech zbarví se jádra, vlastně jejich struktura, velmi určitě a jasně na černo. Barvení děje se velice rychle (za $\frac{1}{2}$ —1 minutu); ohřeje-li se na 40—50° C, jest preparát zbarven okamžitě.

II. Chromokamencový dioxyhematein.

1. Chromový kamenec chemicky čistý 10 g rozpustí se ve 250 g destilované vody a vaří se tak dlouho, až obdržíme zelený roztok.

2. 1 g haematoxylinu rozpustí se za horka v 10 g destilované vody. Oba roztoky se smísí za stálého míchání.

3. Po zchladnutí přidá se do slabě zbarveného roztoku 0·5 g kyseliny sírové (asi 5 cc 10% kyseliny sírové) a konečně se oxyduje barva přidáním:

4. 0·55 g dvojchromanu draselnatého, rozpuštěného v 20 cc teplé destilované vody. Tento roztok necháme zchladnouti a přidáme jej za stálého míchání po kapkách do chromokamencového roztoku haematoxylinu.

Když je vše dobře promícháno, ohřejeme roztok až do varu a při ustavičném míchání vaříme barvu as 2 minuty. Za varu rozpustí se lak téměř úplně. Před barvením nutno barvu vždy filtrovati. Řezy barví se 1—2 minuty. Zbarvení jest modročerné; barví se distinktně jádra, něco málo plasma. Barva jest velice trvalá a doporučuje se mnohem lépe než obyčejné kamencové haemateiny.

Weigertův haematoxylin. Haematoxylin tento není vlastně barvivem v pravém slova smyslu, nýbrž dává později se solemi chromových kovů lak a upotřebí se jen ve speciálním barvení nervových vláken, jak později uvedeme.

| | |
|---------------------|--------|
| Haematoxylin cryst. | 1 g |
| alkohol. abs. | 10 cc |
| destil. voda | 90 cc. |

Kultschický - Wolters kyselý haematoxylin (používá se jako předešlý jen při speciálním barvení Weigertovy metody na vlákna nervová).

| | |
|-----------------|--------|
| Haematox. cyst. | 1 g |
| kys. oct. led. | 2 cc |
| voda dest. | 100 cc |
| alkohol 96% | 10 cc. |

Karmínová barviva.

Karmín byl všeobecně užíván jako barvivo po uveřejnění práce Gerlachovy r. 1858. Před ním již používal karmínu r. 1851 Corti. Jest podnes v histologii používán, avšak ne již v tak velké míře, poněvadž technika histologického barvení může se dnes vykámati různými barvivy, která značně předčí karmín. Každému jest známo, že některá barviva karmínová, jako ammoniakální karmín a j., nedávají takových výsledků, jak bylo dříve hlášáno; přitom se však neběře zřetel k tomu, že dnešní technika fixování, zalévání atd. má velký vliv na následné barvení. V tom jest hlavní vada neuspokojivých výsledků při barvení barviv karmínovými. Náhradou za nevyhovující ammoniakální karmín máme dnes velkou řadu jinak připravených karmínů, které daleko předčí karmín ammoniakální. Dále nalezneme četnou literaturu o přípravě t. zv. pikrokarmínu, který taktéž neodpovídá požadavkům, které byly na něho kladeny. P. Mayer přináší rozbor tohoto barviva a jeho přípravu, jakož i upotřebení, a dochází k výsledku, že pikrokarmín není chemická sloučenina, jak se domníval R a n v i e r, nýbrž docela nestálá směs pikranu ammonatého, ammoniakálního karmínu a volného ammoniaku, která působí mnohdy velice zlobně na preparáty. Jen v tom řídkém případě, chová-li velice málo volného ammoniaku a dosti ammoniakálního karmínu, dává dvojité zbarvení. Zcela správně praví Mayer, že pikrokarmín má historické právo; objevením jeho stal se veliký pokrok proti dříve užívanému „B e a l l o v u“ karmínu. Dnešní dobou však musíme dáti přednost kamencovému boraxovému karmínu, parakarmínu a jiným více.

Následkem podstatných a doložených důvodů uvádíme jen ona karmínová barviva, u kterých docílíme skutečně dobrých výsledků.

Velice dobré barvivo skýtá kamencový výtažek košenily dle C z o k o r a :

| | |
|-------------------------------|-------|
| Košenila (celí sušení červci) | 1 g |
| kamenec draselnatý | 1 g |
| voda dest. | 100 g |

Barvu si připravíme takto: Košenilu s kamencem roztřeme na prášek, který vaří se ve vodě tak dlouho, až se voda asi na polovinu odpaří. Roztok necháme vystydnouti a důkladně dvakráte profiltrujeme. Obdržíme červené namodralé barvivo, které barví jádra buněčná tmavě, plasma světle červeně. Fixace preparátů může býti libovolná; po alkoholu, sublimátu, formolu a j. barví preparáty dosti rychle a nepřebarvuje jich; po chromových solích barví pomaleji. Aby se zamezilo bujení plísní, možno do roztoku přidati trochu phenolu nebo formolu. Doporučuje se užívati čerstvě připravených barev, neboť po delší době se košenila sráží a barvení není čisté, poněvadž vznikají lehce sraženiny v preparátech. Toto barvivo jest velice dobré na probarvování preparátů v celku.

Košenila na černo barvící. Hensen udává přípravu ferrikošenily následovně: 8 g železitého kamence (Ferriammoniumsulfat) rozpustí se ve 250 g dest. vody; 5—10 g na prášek roztřené košenily smíchá se s tímto roztokem a přidá se k němu 15 cc 10% kys. sírové. Za stálého míchání zahřívá se vše až do varu a nechá se 15—20 minut vařiti. Poté přidá se opět do barvy 10 cc 10% kys. sírové. Když roztok vychladne, filtruje se, čímž obdržíme barvu černohnědou, velice stálou. Řezy barvíme 5—10 min. a vymýváme dest. vodou; v obyčejné vodě se barva ještě lépe fixuje. V případě přebarvení možno preparát odbarviti a to buď zvolna ve 2—4% kyselině octové nebo rychle v 0.5% kys. sírové. Barvu možno doporučiti co nejlépe, hodí se k barvení po různých fixacích.

K a r m í n k a m e n c o v ý. (Grenacher.)

| | |
|-----------------|---------|
| karmín | 0.5—1 g |
| kamenec drasel. | 1—5 g |
| voda dest. | 100 g. |

Směs vaříme asi 10—20 minut a obdržíme červenou, do modra odstíněnou barvu, kterou po vychladnutí filtru-

jeme. Jest radno připravit si vždy čerstvou barvu v menším množství v eprouvettě, neboť nezáleží příliš na poměru karmínu ke kamenci. Po vychladnutí zbývá vždy usazenina karmínová, který byl jen zčásti v kamenci rozpuštěn. Barvení není příliš intensivní, přebarvení nikdy se nevyskytuje. Fixace preparátu jest libovolná. Toto barvivo jest výhodné k probarvení v celku, hlavně po fixaci v alkoholu, sublimátu, pikrové kyselině a j. v.

K a r m k a m e n e c. (Karmalaun dle P. Mayera.)

| | |
|----------------------------------|---------|
| karmínová kyselina (firmy Merck) | 1 g |
| kamence draselnatý | 10 g |
| voda dest. | 200 cc. |

Rozpouští se za tepla, nechá se usadit a za studena se filtruje. Jako antiseptikum přidá se něco formolu nebo salicylové kyseliny (0·25 g). Roztok jest trvanlivý. Fixace preparátů libovolná. Barví též preparáty po kyselině osmičelé. Řezy, které po zbarvení vypíráme vodou, mají též plasma buněčné zbarveno. Hodláme-li docílití elektivního zbarvení jader, vypíráme řezy v roztoku kamence, který musíme opět z řezu vodou odstraniti. Karmkamenec probarvuje a vniká lépe do preparátů v celku než karmín kamencový. Důležité jest povšimnouti si při barvení toho, aby preparáty nereagovaly alkalicky.

Veškerá uvedená barviva s kamencem jsou ve výsledku stejnocenná. Po čase sráží se barvivo na dně a na stěnách láhve, jen karmkamenec zůstává na dlouho čistým. Karmínových barviv dle různých údajů (Schneider, Haman, Henneguy a j.) s kyselinou octovou připravených nemožno doporučiti dle vlastních i jiných zkušeností, pročez jich ani neuvádíme.

Basické t. zv. neutrální karmíny.

M a g n e s i a k a r m í n. (P. Mayer.)

| | |
|---------------|--------|
| Karmín | 1 g |
| Magnesia usta | 0·1 g |
| voda dest. | 50 cc. |

Směs vaří se as 5 minut, nechá se usaditi a vychladlá se filtruje. Jako antiseptikum přidá se několik kapek formolu (3—5 kapek). Barva zůstává dlouho čistou, ne-

sraží se, barví jak řezý tak preparáty v celku. Po barvení vypírá se preparát ve vodě.

A m m o n i a k á l n í k a r m í n (dle **R a n v i e r a**). Karmín rozpouští se ve vodě, do které se dá jen tolik ammoniaku, aby se karmín rozpustil (musí mítí barvu fialovou, nikoliv krvavě červenou)! V široké nádobě nechá se za studena na vzduchu odpařovati. Sušina rozpouští se ve vodě. (Karmínu toho upotřebuje se velice zřídka, neboť jiné, preparátům neškodné karmíny zaručují ne-li lepší, tedy alespoň stejné výsledky.)

L i t h i o v ý k a r m í n (Orth.):

| | |
|------------------|---------|
| karmín | 1 g |
| lithium carbonat | 1·2 g |
| voda dest. | 100 cc. |

Preparáty obarvené dlužno differencovati v 70% alkoholu, do něhož přidána kyselina solná (na 100 cc alkoholu 1 cc kyseliny solné). Barví rychle jádra buněčná po fixaci alkoholem a chromovými solemi. (Nedoporučuje se, poněvadž příliš maceruje preparáty.)

Alkoholové karmíny.

B o r a x k a r m í n (Grenacher):

| | |
|--------------|---------|
| Karmín | 2 g |
| borax | 4 g |
| dest. voda | 100 cc |
| alkohol. 70% | 100 cc. |

Borax rozpustí se ve vodě, přidá se karmín a směs vaří se 10—20 minut, do vychladlé směsi přidá se alkohol, načež se filtruje. Řezý probarvené borax karmínem se přenesou přímo do 70% lihu s kys. solnou (4—6 kapek na 100 alkoholu), kde zůstanou tak dlouho, pokud kontrolou pod mikroskopem nevidíme, že veškerá barva se nalézá v jádrech a že plasma je bezbarvé. Barvy této se používá též při barvení v celku, leč u poněkud větších preparátů vytvářejí se uvnitř sraženiny, kterých nemožno již v kyselém lihu rozpustiti. (Probarvené řezý nebo preparát v celku nesmí přijíti do vody, sice se úplně odbarví; jest nutno přenéstí jej přímo do 70% lihu!)

Parakarmín. P. Mayer:

| | |
|--------------------|---------|
| karmínová kyselina | 1 g |
| chloraluminium | 0·5 g |
| chlorcalcium | 4 g |
| 70% alkohol | 100 cc. |

Směs rozpustí se za tepla nebo za studena; přebytek usadí se na dně, čisté barvivo se sfiltruje. Toto jest barvy světle červené a hodí se dobře na probarvení v celku. Protoplasma barví se růžově. Chceme-li docíliti elektivního zbarvení jader, přidáme do alkoholu, ve kterém preparáty vypíráme, chloraluminium nebo 2·5% ledové kyseliny octové. Preparáty nesmějí reagovati alkalicky.

Karmín s kyselinou solnou. (Grenacher-Mayer):

| | |
|----------------|-----------|
| karmín | 4 g |
| voda dest. | 15 cc |
| acid. chloric. | 30 kapek. |

Karmín rozpustí se ve varu a do této barvy přidáme 95 cc alkoholu 85%. Směs filtrujeme za horka a neutralizujeme ammoniakem tak dlouho, až pozorujeme, že právě zůstává trvalá sraženina. Po vychladnutí filtrujeme znovu. Roztok barvy smí se ovšem jen silným alkoholem zřediti. Obarvené preparáty vymyjí se přímo v 80—85% lihu; pro elektivní zbarvení jader přidá se do alkoholu kapka kyseliny solné.

Preparáty udanými karmíny zbarvené možno zbarviti ještě žlutě kyselinou pikrovou a docílíme tak úspěchu dvojitého zbarvení jako při barvení t. zv. pikrokarmíny.

Barviva dehtová.

Barviva dehtová, která nesprávně jsou nazývána barvivy anilinovými, zaujímají v dnešní histologické technice barvení přední místo. Dle chemického složení rozlišuje Ehrlich barviva dehtová kyselá, zásaditá a neutrální. Dovojuje dále, že barviva zásaditá barví jádra, barviva kyselá plasma. Barviva neutrální mají prý zvláštní vztahy k určitým elementům plasmatu buněčného k t. zv. granulům; dle zbarvení granul rozeznává opět granula acidó-, basó- a neutrofilní, která ještě dále rozlišuje: acidó-

filní α) β) atd. Dlužno mít na zřeteli, že Ehrlich odvozuje toto rozlišování z barvení krevních preparátů na skélku sušených. Zeela jiné poměry nacházíme ovšem při barvení řezů preparátů. Přesvědčíme se velice snadno, že na př. zásadité barvivo „safranin“ barví jádra, použije-li se však určitých mořidel, barví pouze plasma buněčné. Methylová modř při intravitálním barvení přechází hlavně na plasma, ač jest barvivem zásaditým. Vesunin (Bismarekova hněd) a methylová zeleň barví jádra přímo, aniž bychom použili zvláštního odbarvování, avšak téměř všechna ostatní barviva dehtová dávají barvení jen po nepřímé — regressive methodě.

Roztoky dehtových barev k barvení histologickému určené musí býti, pokud možno, ve vodě koncentrované; kde se základní barva ve vodě nerozpouští, přidáme trochu alkoholu. Mnohdy rozpouštíme barvivo v emulsi anilinového oleje s vodou nebo v karbolové kyselině, a to proto, aby se co nejvíce barviva rozpustilo. Čím koncentrovanější jest roztok a čím déle barvíme, tím intensivnější zbarvení preparátu obdržíme.

Pro veškerá barvení dehtovými barvivy jest tento pořad: řez, pokud možno tenký, (nebo celé serie řezů), vložíme do roztoku barviva, ve kterém jej ponecháme různě dlouho, čím déle, tím lépe, až i 24 hod. Roztoky s anilinovým olejem barví mnohem rychleji, některé již za několik minut. V roztoku zbarví se celý řez úplně difusně tak tmavě, že nerozeznáváme rozdílů ve tkáních. Řez takto obarvený důkladně propíráme v destilované vodě, a z této jej přeneseme do tekutiny určené k diferenci cov á n í; tou bývá obyčejně alkohol.

Z řezu, jakmile byl dán z vody do alkoholu, počne v obláčcích vystupovati barvivo, které v krátké době všechen alkohol zbarví. Řez dlužno přenést do čerstvého alkoholu, ve kterém odbarvujeme preparát tak dlouho, pokud barva z preparátu vystupuje. V některých případech jest radno přidati trochu málo kyseliny solné (as 1 : 1000), jelikož diferenci cov á n í postupuje mnohem rychleji. K diferenci cov á n í používáme alkoholu 96%. Jakmile přestane barva z preparátu odcházeti, jest diferenci cov á n í ukončeno, a řez možno přenést ihned do prosvětlujícího prostředí, oleje origanského, xylolu, carbolxylolu a j. a pak do kanadského balsámu.

Nutno upozorniti na to, že některé oleje, zvláště řebíčkový, snadno barvy dehtové rozpouštějí, a když differencovaný řez jest vložen do tohoto oleje, může se státi, že všechnu barvu z preparátu „vytáhne“. Proto nutno používatí takových olejů, které nemají na barvu vlivu. Někdy jest ovšem výhodné, když se určitá část barviva, která ještě po alkoholu v preparátu zbude, extrahuje olejem; ovšem dlužno předem věděti, v kterém případě můžeme k tomu připustiti. Vždy nutno míti na paměti, že v preparátě nesmíme ponechatí si stopy řebíčkového oleje, když jej přenášíme do kanadského balsámu, neboť i potom zbytek oleje extrahuje barvu a odbarví časem preparát úplně. Jest vždy radno, buď olej ssacím papírem důkladně z řezu vysušiti a řez ještě v xylolu vyprati, aby byl všecken olej odstraněn, nebo řez z oleje do xylolu přenéstí a pak teprve uložití jej do kanadské pryskyřice. Jen tak jest možno preparáty na delší dobu zachovati. Mnohé preparáty dehtovými barvami zbarvené podrží po léta svůj původní vzhled, jiné se naopak po kratší nebo po delší době vůbec odbarví.

Dehtová barviva dávají brilantní, ponejvíce distinktní zbarvení, však jednu vadu přece mají, že totiž substance barevná není vždy táž. Velice často se stává, že určité barvivo dávalo velice pěkné zbarvení a vždy přesně odpovídalo požadavkům do něho kladeným, při nové objednávce téže barvy obdržíme však pod stejným označením barvivo, které jest úplně nevhodné. S tím zlem nutno počítati.

Přímé barvení dehtovými barvami.

V r. 1916 bylo v Zeitschr. f. mikrosk. Technik uvedeno více prací, které pojednávají — z hospodárných důvodů v letech válečných — o způsobu barvení preparátů dehtovými barvami bez velké spotřeby alkoholu. Paraffinové řezy kladeny byly přímo z nože na teplou barvu a po natažení a obarvení byly obyčejným způsobem lepeny na podložní skla. Po zaschnutí byly v málo alkoholu vymyty a montovány.

B. Rejsek vycházejí z předpokladu, že různými dehtovými barvami, buď koncentrovanými (vesuvin, Unna-Pappenheim atd.), nebo značně zředěnými (Giemsa, meth. modř atd.), možno preparáty barvití přímo, vkládal na teplé vodě natažené a vyrovnané paraffinové řezy

do barvy, na jejíž hladině je nechal plavati, dle zředění barvy, po 5 min. až 24 hodin. Poté přenesl řezy do dest. vody v nadbytku a vodu přivedl pipetou do pohybu za účelem „oprání“ preparátu. Potom řezy kladl na bílkované podložní sklo a nechal je přischnouti. Po usušení odstraní paraffin xylolem a preparát montuje do kanadské pryskyřice. Výhoda této metody spočívá hlavně v tom, že barvení jest velmi elektivní a kontrastní. Doporučuje ho zvláště tam, kde jde o metachromasii, a dále pro barvení mikrobů v tkáních (*Streptobac. Ducrey*, *Gonococcus* atd.).

A n i l i n o v á v o d a jest mnohdy nutnou součástí při udávání barvicí metody; proto již předem podáváme její přípravu. Vodu anilinovou připravíme si vždy čerstvou, a to z oleje **a n i l i n o v é h o**, který musí býti čerstvý, nezredukovaný, úplně čirý, ne žlutý nebo dokonce již silně hnědý. Do eprouvetty, destilovanou vodou do $\frac{1}{2}$ naplněné, dáme as 0.5—1 cc oleje, načež směs delší dobu důkladně protřepáváme, aby se voda pokud možno nejvíce olejem nasýtila. Voda takto připravená obsahuje as 3% oleje. Protřepanou tekutinu filtrujeme, filtr však dříve prolejeme destilovanou vodou.

Nejvíce v histologii užívaná dehtová barviva k barvení jader buněčných jsou: safranin, gentianová violet, dahlia, tolluidin, thionin, Bismarkova hněd (Vesuvín).

S a f r a n i n dává ohnivě červené a trvalé zbarvení jader. V obchodě prodává se velice mnoho druhů safraninu, většinou v alkoholu, méně ve vodě rozpustných. **F l e m m i n g** používá koncentrovaného roztoku v alkoholu, který rozředí na polovinu vodou.

B a b e s používá rovněž koncentrovaného roztoku alkoholického za tepla, a rovněž též za tepla jím barví.

B a b e s Virch. (Arch. 105) doporučuje barviti preparáty, které byly fixovány v tekutině **F l e m i n g o v é** nebo **H e r m a n n o v é**, směsí safraninu s anilinovým olejem dle receptu:

Safranin v prášku v nadbytku
Destilované vody 100 dílů
Anilinov. oleje 2 „

Zahřáti na 60° C a filtrovat vlhkým filtrem.

Z w a a r d e m a k e r mísí koncent. alkoholický roztok s anilin. vodou na polovici. Differencování obarvených

řezů děje se alkoholem, buď čistým nebo smíšeným se slabou kyselinou solnou.

Řezy po Flemmingově tekutině barví se 12—24 hodin; při differencování rozhoduje to, zda mají jádra býti zbarvena, nebo jen jejich chromatinová substance. Po prvé differencujeme kratší dobu, po druhé déle, zvláště jde-li o mitotické dělení jader. Odbarvujeme-li, můžeme použítí *Gramovy* metody s jodem. (Viz *Gramova* metoda odbarvovací!)

Babes. Dest. voda 50, alkohol 50, safranin tolik, kolik se rozpustí (barvíme 12—72 hod.).

Zřejmě jest, že ve všech předpisech jest koncentrovaný roztok safraninu + alkohol.

Gentianová violeť. Rozpouští se ve směsi polovice alkoholu a vody. Řezy se přebarví (po alkoholu a formolu stačí barvení 5 minut, pro řezy po chromových solích a Flemmingově tekutině jest radno barvití po více hodin [až 24 hod.]) a odbarvují se buď v čistém alkoholu, který se několikrát změní, až se nezbarvuje, nebo se použije alkoholu, do něhož přidána nepatrná část kyseliny solné.

Gentiana dle Ehrlicha rozpouští se v anilinové vodě a alkoholu.

| | |
|-----------------------|-------|
| <i>Gentiana viol.</i> | 1 g |
| alkohol abs. | 15 cc |
| anilinový olej | 3 cc |
| voda dest. | 80 cc |

Obarvené řezy, které se na podložním skélku rozprostrou, polijí se roztokem jod-jodkalia, 1 g jodu a 2 g jodkalia v 300 cc vody. V této směsi řezy změní barvu, zhnědnou, načež se odbarvují v čistém alkoholu.

Dahlia, *tolluidinová* modř, *thionin* a podobná barviva dávají výsledek jako předešlá; barví jádra buněčná a při barvení počínáme si právě tak, jako u jiných barev dehtových. Řezy se přebarví a differencují potom v alkoholu.

Bismarckova hněď (*Vesuvín*). Barviva toho používá se nyní v histologii velice zřídka. Roztok připravíme buď vodný nebo ze dvou třetin vody a ze třetiny alkoholu. Bismarckovy hnědi po přidání kyseliny octové možno použití při barvení čerstvého materiálu nebo bar-

viti déle řezy a potom alkoholem differencovati. Preparáty možno uložit do glycerinu nebo do kanady.

M e t h y l o v é z e l e n ě můžeme s dobrým výsledkem použít na čerstvém materiálu v roztoku vodném se stopou kyseliny octové. Barví hlavně chromatinovou substanci jádra světle zeleně, ostatní část jádra nebarví. Barvivo jest velice citlivé oproti alkaliím.

B a r v i v a n a p l a s m a b u n ě č n á jsou taková, která zabarvují plasma a základní hmoty tkání, jádra však zůstanou nezbarvena, nebo zbarvena jsou jen diffusně. Barviv těchto používáme dosti často, obyčejně však v kombinaci s barvou jádra elektivně barvící, kteréžto barvení nazýváme **d v o j i t é**. K dvojitému zbarvení volíme barviva kontrastní, tak na př. zbarvíme-li jádra modře kamencovým haematoxylinem, zbarvujeme plasma růžově (eosinem, kys. fuchsinem), nebo žlutě (pikrovou kyselinou), nebo oranžově (oranží, congovou červení); jsou-li jádra červeně zbarvena karmíny nebo safraninem, zbarvíme plasma modře (indigem, modrým anilinem a p.). Někdy se používá barvení trojitého, totiž různé zbarvení jader, plasmatu a vaziva. Takové barvení nám dává metoda **G i e s o n o v a** a jiné podobné kombinace; je to zbarvení po kamencovém haematoxylinu směsí kyselého fuchsínu s kyselinou pikrovou. Trojitě barvení (po případě vícenásobné zbarvení, jednak v různých nuancích, jednak směsí barev) dává zbarvení metodou **E h r l i c h o v o u** po t. zv. triacidu. Je to směs kyselého fuchsínu, oranže a methylové zeleně. Podobná směs jest barvivo **B i o n d i h o**. Barvení triacidem jest velice nejisté a možno směle říci, že ani dva stejné preparáty stejným způsobem najednou barveny nedávají stejných výsledků a vedou po většině k nesprávným výkladům, hlavně bře-li se zřetel k zbarvení smíšených barviv, na př. zbarví-li se některé vazivo červeně nebo více méně oranžově atd.

Většinou (ne-li vůbec) stačí při dvojitém barvení eosin, pikrová kyselina aneb Giesonova metoda.

E o s i n. V obchodě možno obdržeti velice mnoho různých eosinů, z nichž některé jsou rozpustné ve vodě, jiné v alkoholu. Mnohdy užijeme roztoku zředěného, jindy opět koncentrovaného. Dle zkušeností dává koncentrovaný roztok **m e t h y l o v é h o e o s i n u** úplně spolehlivý výsledek.

Pappenheim - Unna. Pyronin methylová zeleň:

| | |
|---------------------|---------|
| Methylová zeleň | 0.15 g |
| Pyronin | 0.25 g |
| Alkohol 96% | 100 ccm |
| Glycerin | 20 ccm |
| Karbolová voda 0.5% | 100 ccm |

Barví velice pěkně po fixaci v alkoholu nebo sublimátu.

Kamencový haematoxylin-eosin. Preparáty obarví se nejdříve haematoxylinem, důkladně se ve vodě vyperou a vloží se do eosinu; použije-li se eosinu koncentrovaného, tu ponecháme v něm preparát jen krátkou dobu (několik vteřin), při slabém roztoku ovšem déle; pak preparát opláchneme ve vodě a přeneseme do alkoholu, který však eosin z preparátu rychle „vytahuje“, a proto jest lépe užívatí koncentrovanějšího roztoku a preparát poněkud přebarviti. Z alkoholu přeneseme preparát do oleje origanského a do pryskyřice. Též možno postup barvení obrátiti, totiž obarviti diffusně nejdříve eosinem, dobře preparát vymýti ve vodě a pak barviti haematoxylinem.

Je nutno vždy preparát dobře vymýti vodou, jelikož eosin s haematoxylinem se sráží.

Eosinu možno použití na barvení plasmatu buněčného po barvení barvami dehtovými jako gentianou, dahlíí, tolluidinem a j. Velice pěkných obrazů docílíme při barvení methylovou modří a eosinem, avšak při barvení eosinem dlužno míti na zřeteli, že eosin velice rychle odbarvuje methylovou modř. Proto nutno dáti pozor, jak dlouho preparát v eosinu máme ponechati. Bývá radno preparát modře přebarvený důkladně ve vodě vyprati a aniž ho dříve alkoholem differencujeme, vložití jej do eosinu a pak teprve do alkoholu. Tak obdržíme velice pěkné kontrastní dvojité zbarvení.

Kyselina pikrová zbarvuje plasma, hladké svalstvo, vazivo atd. žlutě. Užívá se jí ke dvojitému zbarvení po kamencovém haematoxylinu, haemateinu, po košenil. kamenci, karm. kamenci, boraxovém karmínu i po jiných zbarveních.

Haematoxylinem nutno řezy silně zbarviti, jelikož kyselinou pikrovou se haematoxylin odbarvuje. Po barvení jader v preparátech ukládáme řez do koncentrovaného

vodného roztoku kyseliny pikrové a odvodníme potom v alkoholu. Alkohol rychle „vytahuje“ kyselinu pikrovou z preparátu, proto jest nutno alkohol, kterého použijeme, před vložením řezů do oleje zbarviti již předem kyselinou pikrovou. (Krystal kyseliny pikrové rozpustíme v lihu.) Ke zbarvení řezů kyselinou pikrovou stačí použití alkoholu s kyselinou pikrovou; vyjasníme-li několik preparátů, které byly kyselinou pikrovou zbarveny v oleji origanském neb jiném, tu vytáhne olej tolik pikrové kyseliny z preparátů, že následující preparát předem žlutě nezbarvený obarví se v něm dostatečně žlutě.

O r a n ž e G. používá se ve vodném koncentrovaném roztoku; řezy předbarvené necháme v roztoku oranže as 5 min., avšak ani po delší době nenastává přebarvení. Toto dvojité přebarvení jest v mnohých případech velice vhodné, na př. v řezech žaludku zbarví se intensivně velké krycí buňky, kdežto základní zůstávají světlé; podobně se barví a pěkně vyniknou acini pankreatu.

V a n G i e s o n o v a směs kyseliny pikrové s kyselým fuchsinem dává ve většině případů velice dobré zbarvení. Řezy předbarví se silně haematoxylinem kamencovým (použijeme haematoxylinu připraveného dle kteréhokoliv předpisu), potom vloží se do směsi dle Giesona. Tato směs sestává asi ze 100 dílů koncentrovaného roztoku kyseliny pikrové, 5 dílů 1% vodného roztoku kyselého fuchsinu. Určitého složení této směsi není a nutno zkusmo se přesvědčiti, zda se řez barví příliš červeně, nebo naopak příliš žlutě. Nejlépe učiníme, když 1 díl základní směsi rozředíme 10 díly pikrové kyseliny a necháme-li v této směsi řez poněkud déle. Při odvodňování preparátu hledíme k tomu, aby alkohol před olejem obsahoval trochu kyseliny pikrové; jinak se často stává, že alkohol kyselinu pikrovou z řezu vůbec odbarví. Použijeme-li základního silného roztoku, tu barvíme řez jen několik málo vteřin a hned odbarvujeme v alkoholu. Při správném odbarvení obdržíme elementy různě zbarvené; vazivo červené, hladké svalstvo žluté, jádra modrá atd.

Methody této možno použití jen na řezech.

O. V ö l k e r (Ztschft. f. w. M. Bd. XXX. 1913) modifikuje barvení van Giesonem takto: Připravíme si 0.1% vodný roztok kyseliny pikrové a 0.1% vodný roztok kyselého fuchsinu. Po odstranění paraffinu z nalepených řezů barvíme tyto ve směsi: ve 100 ccm roztoku kys. pik-

rové a 0.5 ccm roztoku fuchsinu po dobu 12—24 hod. Po obarvení nutno preparát rychle opláchnouti v okyseleném alkoholu (několik kapek kys. octové na 100 ccm alkoholu) a přes xylol přenést do kanadské pryskyřice. Takto možno barviti i jemné celloidinové řezy. Touto methodou zbarví se i nejjemnější vlákna kollagenního vaziva ohnivě červeně. Chceme-li obdržeti čisté zbarvení kollagenních fibrill, nesmíme předbarviti haematoxylinem.

B e n d a. Modifikace barviva Van-Giesonova:

| | |
|---|--------|
| Koncentrovaný roztok pikranu ammonatého | 95 ccm |
| 1% roztok vodného kyselého fuchsinu | 5 ccm |

Tento základní roztok jest barvy m o d r o č e r v e n é. Před upotřebením nalijeme asi 10 ccm základního roztoku na hodinové sklíčko a vkápneme do něho asi 2—5 kapek koncentrované kyseliny pikrové; barva se ihned změní na žlutočervenou. Řezy již předem haematoxylinem zbarvené (v případě přebarvení nutno je dříve v kyselině octové odbarviti) vložíme na 10—15 minut do pikrin-fuchsinu. Přednost této směsi záleží v tom, že možno řezy dle libosti v barvě odstupňovati, buď žlutší — přidáním kapky kyseliny pikrové — nebo červenější — s menším množstvím kyseliny pikrové. Dále možno řezy i po dlouhou dobu v barvě ponechati, aniž by haematoxylin byl odbarven.

A n i l i n o v á m o d ř. V obchodě přichází více druhů pod různými jmény, z nichž pro histologické práce nejvíce se užívá t. zv. b l e u d e L y o n v alkoholickém roztoku. Řezy ponechají se v slabém roztoku (1/5% dle Baumgartena) 12 hodin a odbarvují se v alkoholu po 6 hodin. T o n k o f f přidává k roztoku málo tinktury jodové, nebo v této řezy vypírá, čímž docílí rychlejšího zbarvení. Jádra barví se některým červeným barvivem (safraninem).

I n d u l i n a n i g r o s i n jsou barviva modrošedá, kterých se používá též po červeném zbarvení jader. Indulinový koncentrovaný vodný roztok zředí se vodou asi 1 : 6 a řezy ponechají se v barvě as 1/4 hodiny, vyperou se ve vodě a přenesou se do alkoholu.

N i g r o s i n u užíváno hlavně na řezy centrálního nervstva, barví gangliové buňky a jich výběžky velice markantně, zabarvuje ovšem též ostatní elementy různě tmavě.

I n d i g - k a r m í n barví sám diffusně, kombinuje se s kamencovým neb boraxovým karmínem. P. Mayer rozpouští 1 g indigkarmínu ve 500 g vody a z tohoto roztoku dělá směs 1 : 4 až : 20 karm. kamencem. S e l l e r barví řezy boraxovým karmínem, které odbarví v kyselém alkoholu (1 cc kyseliny solné, 4 cc alkoholu), promyje potom důkladně vodou a barví indigkarmínem 16—18 hodin (indigkarmín 2 kapky, alkohol 30 cc). Alkohol, kanada.

T r i a c i d E h r l i c h ů v, B i o n d i, H e i d e n h a i n jest směs tří barev, a to oranže G., kyselého fuchsínu a methylové zeleně. Příprava dobrého barviva jest velice obtížná, i doporučuje se koupiti hotový roztok triacidu.

Připravujeme-li si sami toto barvivo, nutno nejdříve pořídit si tři koncentrované vodné roztoky udaných barev, které necháme delší dobu státi, aby se vyčistily. Potom smícháme 14 cc oranže, 7 cc kys. fuchsínu, 15 cc dest. vody, 45 cc alkoholu, 12·5 methylové zeleně, 10 cc alkoholu a 10 cc glycerinu. Barvu nutno dobře třepáním promísiti. Směs Biondiho sestává z týchž barev, avšak při jiném složení. Ke 100 cc koncentrovaného vodního roztoku oranže G. se přidá 20 cc konc. vodního roztoku kys. fuchsínu a 50 cc methylové zeleně; tento základní roztok se rozředí až 100násobným množstvím vody, a tohoto užívá se potom k barvení. Řezy vloží se do barvy na 6—24 hodiny, odvodní se a odbarví alkoholem a uloží do xylolu. Odbarvení jest velice nesnadné, poněvadž alkohol jednotlivá barviva nestejně vytahuje; často se stane, že veškerá barva zelená nebo naopak všechna červená vymizí. Závisí to na reakci alkoholu, který nemá býti ani alkalický, ani kyselý.

H e i d e n h a i n přidává opatrně něco málo kyseliny octové do roztoku, řezy vkládá před barvením na několik hodin do slabé kyseliny octové (as 0·1% kyseliny octové), načež je přeloží do tinktury jodové, vypere v alkoholu a barví potom 12—18 hodin. Odvodní v alkoholu a přenese do xylolu a xylol-balzámu.

C e l l o i d i n o v ý c h ř e z ů naprosto se nemůže použití k barvení Ehrlichovým triacidem nebo Biondiho směsí, jelikož se celloidin zbarví temně zeleně. Barvení to možno provésti jen na velice jemných řezech, které byly provedeny po fixaci sublimátem a zality v parafinu.

Je-li barvení správné, jsou obrazy preparátů velice instruktivní; stává se to však velmi zřídka a proto používá se metody této v nejjednodušších případech.

P. Mayer udává tuto směs: 1 g methylové zeleně, 2 g oranže G., a 3 g kyselého fuchsinu rozpustí se v 80 cc smíšeniny (45 cc dest. vody, 10 cc glycerinu a 25 cc alkoholu); nejprve se rozpustí fuchsin a oranž, potom teprve methylová zelen. K barvení použije se roztoku nezředěného.

R h u m b l e r. Zoolog. Anz. Bd. XVI. 1903.

Dvojité barvení k rozeznání živé tkáně od odumřelé aneb anorganické po konservaci. Materiál ve směsi kys. pikrové s kyselinou sírovou neb v alkoholu tvrzený, po případě preparáty již pikrokarmínem zbarvené, dají se do směsi: methylová zelen vodná 1% 50 dílů, eosin 0.8 v 50% alkoholu 50 dílů, alkohol absol. 50 dílů.

Řezy se ponechají $\frac{1}{2}$ hodiny v barvě, vyperou v dest. vodě a alkoholu, který se pozvolna stupňuje; asi za $\frac{1}{2}$ hodiny přenesou se do oleje a balzámu.

Veškeré orgány, které byly ještě za živa konservovány, jsou sytě červené, veškeré zašlé nebo barvící se látky anorganické, sytě zelené. Jsou-li elementy (orgány) v jednom preparátě zčásti za živa, zčásti již mrtvé konservovány, obdrží se zbarvení červenofialové, fialové, modré a modrozelené. Tato metoda jest zvláště výhodná na protozoa.

V literatuře najdeme ještě velkou řadu údajů o barvení dvojitým, avšak dle zkušeností stačí úplně udané metody. Každý histolog, který má při ruce více dehtových barev v substanci, vyzkouší pro určitý případ různé barvení, leč jisto jest, že po dlouhém zkoušení vrátí se k nejjednodušším a jistě působícím barvivům.

Barvením metachromatickým nazýváme ono, kde po užití jedné barvy obdržíme různé zbarvení, to jest určité buňky nebo tkáně zbarví se navzájem zcela různě. Takovéto zbarvení dává:

P o l y c h r o m o v á m e t h y l o v á m o d ě ř, která zbarví žírné buňky (Mastzellen) červeně, dle metody Unnovy (viz speciální barvení!), amyloid červeně, hyalin růžově atd.

Methylenová modř barví amyloidně zvrhlé tkáně červeně, normální jádra a tkáně modře (speciální barvení amyloidu).

Speciální metody barvení.

Jest udávána velká řada různých způsobů barvení, a vždy nazývá se udání takové „methodou“. Avšak většina jich neodpovídá správné definici „methody“, totiž za určitého postupu dosáhnouti určitého cíle, a proto uvádím zde jen metody spolehlivé, totiž takové, které nám vždy dají dobrý výsledek. Metodu, kterou nedocílíme vždy dobrého výsledku, označujeme dodatkem jako nejistou, nespolehlivou.

Spolehlivou methodou nazýváme na př. zbarvení jader v preparátě kamencovým haemateinem; po utvrzení preparátu v alkoholu, sublimátu a formolu již předem víme, že touto methodou budou jádra určitě zbarvena.

Jiná spolehlivá a jistá metoda jest barvení nervových vláken centrálního nervstva dle Weigerta.

Nespolehlivá a naprosto nejistá jest Bethého metoda barvení fibril nervových tolluidinem (viz níže!)

Méně spolehlivou methodou jsou různé impregnace a barvení solemi těžkých kovů, jako zlata nebo stříbra.

Je tudíž nutno při každé methodě bráti zřetel k tomu, že dlužno počítati s mnohými činiteli, že neznámá úchylka kteréhokoliv z nich může nám dáti úplně jiný výsledek než ten, který očekáváme, a že většinou teprve po mnohých a mnohých zkouškách obdržíme preparát správně zbarvený, ač ještě ne vždy.

Nebude snad na škodu upozorniti, že mnohé z method uváděných mají význam hlavně pro badatele v širším slova smyslu, a to právě ony metody nespolehlivé, kde ovšem stačí některá malá část t. zv. podařeného zbarvení neb impregnace, ze které jest dána možnost dalších úsudků. Jiné metody, které jsou více demonstrační, jsou zpravidla spolehlivé. Správné jest, dokud taková metoda nespolehlivá zůstává jen v rukou odborníka histologa, který hledí buď methodu zdokonaliti, nebo výsledky methodou touto docílené dovede po důkladném studiu srovnávacím oceniti; avšak method takových používá se i v jiných případech, na př. pathologických, a tu ovšem dochází k nálezům a údajům většinou nesprávným. Tak na př. používání metody impregnace neb barvení fibril

vláken nervových v pathologických případech; tam, kde se fibrily neobarví, vykládá se to jako pathologický zjev, leč totéž se stává i u materiálu absolutně normálního. u kterého nemožno přece usuzovati na zjev pathologický,

Takových a podobných zjevů možno uvést velké řady. Nálezy takovými nejistými methodami získané nutno vždy náležitou kritikou pozorovati a oceniti.

Speciální metody barvení a impregnace nervové soustavy.

Myelin nervových vláken za čerstva vyšetřujeme tím způsobem, že nerv jehlami na nejjemnější vlákna roztrháme. Pod mikroskopem vidíme zřetelně lesklý obal nervů — pochvu myelinovou. Osový válec možno viděti, zabarvíme-li ho slabě methylenovou modří Ehrlichovou (viz níže), nebo karmínem.

Osmičelá kyselina barví myelin nervu na černo. Postupujeme následovně. Za čerstva vyňatý periferní nerv očistíme od vaziva (perineurium) ostrými jehlami. Pak vložíme nerv na 24 hodin do 0·5—1% kyseliny osmičelé. Nerv úplně zčerná, vazivo nabude barvy hnědé. Nyní možno nerv vyšetřovati přímo, totiž trháním v glycerinu, neb uložiti jej do alkoholu, zalíti do celloidinu a rozřezati na řezy podélné nebo příčné. Jest nutno upozorniti, že kyselina osmičelá velice těžce prostupuje preparátem do hloubky. Často se stává, že na povrchu jest nerv již úplně černý, kdežto uvnitř jsou vlákna nervová dosud úplně bílá bez zabarvení. Proto nutno jen malé kousky tenkých nervů do kyseliny osmičelé v celku ukládati a silnější nervy na menší částky roztrhati. Barviti možno na jádra, po případě na osový válec, buď haematoxylinem delafieldským, nebo barvami dehtovými (kyselým fuchsinem osový válec.)

Neurokeratin obdržíme, odstraníme-li myelin z nervového vlákna. Uložíme-li nerv do směsi alkoholu a aetheru, rozpustí se myelin a zbude Schwanova pochva i osový válec, a v místech, kde uložen byl myelin, nalezneme zvláštní síťovité útvary, t. zv. neurokeratin.

Dle Corninga možno obdržeti neurokeratin z nervů které byly osmiované. Řezy z paraffinu uložíme do bergamottového oleje a necháme je v něm tak dlouho ležeti, až olej černou barvu po osmiu vytáhne, načež odstranivše olej, obarvíme řezy železitým haematoxylinem.

Argentum nitricum na barvení osového válce. Roztrhaný čerstvý nerv vložíme do 0·5% *Arg. nitr.*, omyjeme jej ve vodě a vložíme do 1% kyseliny mravenčí nebo methylového alkoholu na světle. Osový válec se od *Ranvierových* zářezů na kratší nebo delší vzdálenost zabarví hnědočerveně a ukazuje příčné žíhání.

Barvení řezů centrálního nervstva.

Weigertova metoda na myelin lakem haemateinu. Methody této používá se všude tam, kde jde o prokázání nervů s pochvou dřevnou a dále, kde má být prokázáno vymizení nervstva, na jehož místo nastoupila jiná tkáň, tudíž po déle trvajících degeneračních pochodech nervové tkáně, aneb konečně tam, kde nervstvo není ještě všude vyvinuto, jako v embryonální a postembryonální době v míše a mozku.

Materiál, který hodláme barviti *Weigertovou* methodou, musí být fixován a tvrzen chromovými solemi. Celé mozky se nejlépe konservují a fixují bichromátem tím způsobem, že injikujeme tekutinu přímo do cév mozkových, čímž mozek se rychle a jistě fixuje, potom teprve vložíme jej na delší dobu do tekutiny *Müllerovy*. U zvířat je nejlépe injikovat *Müllerovu* tekutinu a. carotis communis ke hlavě, a pak teprve vyjmouti mozek. Materiál mohl být předem fixován též formolem; má-li se však později barviti *Weigertovou* methodou na vlákna nervová, tu nutno jej uložiti do dvojchromanu draselnatého. Preparáty, které dlouho ležely v alkoholu po *Müllerově* tekutině a nabyly již barvy zelené, možno jen tehdy zbarviti, když byly dříve chromem dobře prostoupeny.

Postup barvení methodou *Weigertovou* jest tento: Řezy (z celloidinu) vložíme do roztoku haematoxylinu:

| | |
|------------------|-------|
| haematox. cryst. | 1 g |
| alkohol | 10 cc |
| dest. voda | 90 cc |

Do tohoto haematoxylinu dáme před upotřebením několik kapek koncentrov. vodního roztoku lithium carbonicum. Haematoxylin nabude červeně fialové barvy.

V tomto roztoku necháme řezy asi 2—24 hodiny ležeti, až úplně zčernají; vytvořil se totiž z haematoxylinu za přítomnosti chromu zvláštní chrom-haematoxylinový lak, který jest nerozpustný ve vodě i v alkoholu. Zbarvené řezy dobře promyjeme v dest. vodě a pak přeneseme do odbarvovací tekutiny, kterou připravujeme si do zásoby takto:

| | |
|-----------------|---------|
| ferrieyancaleum | 2.5 g |
| borax | 2.0 g |
| aqua dest. | 100 ccm |

V této tekutině se řez odbarvuje po několika minutách, a to nejdříve šedá hmota, která vystupuje jako světlejší žlutavé políčko. Odbarvujeme tak dlouho, až celý řez je úplně differencován, totiž až rozpoznáme kresbu šedé a bílé hmoty. Sražený haematoxylinový lak zůstane vázán pouze na místech, kde nerv chová myelin. Veškerá ostatní tkáň se odbarví a zůstává žlutou s nádechem do červená. Poněvadž chromové soli vypráním materiálu ve vodě a tvrzením v alkoholu a opětným praním řezů ve vodě, alkoholu atd. se z preparátu vyluhují, jest prospěšno před ukládáním řezů do barvy vložit tyto as na 2—24 hodiny do koncentrovaného vodného roztoku neutrálního octanu měďnatého. (Cuprum aceticum neutrale). Prosycené řezy tímto roztokem, kterého se užívá taktéž jako mořidla, drží lak velice dobře, a není třeba se obávat, že by se řezy další manipulací přespříliš odbarvily.

Do octanu měďnatého možno vložit i řezy seriově řezané, na skélko přilepené. Celé kousky míchy nebo mozku možno předem, totiž před zalitím do celloidinu, vložit do octanu na 1—2 dny. Tím odpadne pak ukládání jednotlivých řezů do octanu. Tato methoda barvení, jest naprosto spolehlivá.

W e i g e r t o v a m e t h o d a b e z o d b a r v o v á n í . Material v dvojchromanu draselnatém fixovaný zalije se do celloidinu. Utvrzené špalíčky vložíme do směsi koncentrovaného octanu měďnatého s 10% roztokem soli Seignettovy (Kalium-natrium-tartarat) na 24—48 hodin; roztok jednou změníme. Preparáty uložené v udané směsi dáme do thermostatu asi při 40° C; pak přeneseme je do čistého roztoku octanu měďnatého na 24 hodiny a postavíme opět do tepla. Poté preparáty opláchneme důkladně

ve vodě a uložíme na $\frac{1}{2}$ —1 hodinu do 70 % alkoholu. Ze špalíček takto mořených zhotoví se řezy, které se barví v roztoku haematoxylinu s lithiem.

1. Lithium carb. (1·2 g rozpustí se ve 100 cc vody) 7 dílů, aqua dest. 100 dílů.

| | |
|-------------------------|------|
| 2. Haematoxylini cryst. | 1 g |
| Alkohol abs. | 10 g |

K barvení smísíme 7 dílů roztoku 1. a 1 díl roztoku 2., řezy ponecháváme v této barvě 4—24 hodiny, potom dobře vypíráme ve vodě, kterou několikrát vyměníme, načež je z 96 % lihu přeneseme do směsi 1 dílu xylolu a 2 dílů anilinového oleje, potom do čistého xylolu a kanadského balsámu. Mnohdy se stává, že řezy jsou přece diffusně zabarveny; tu nutno s nimi naložiti tak, jako po obyčejné metodě Weigertově, totiž dlužno odbarviti v borax-ferrieyancalium.

Weigertova metoda doznala časem různých modifikací, z nichž nejdůležitější jest Pal-Weigert. Tato metoda spočívá na rychlé oxydaci a následném odbarvení oxydačního prostředku. Řezy připraví se právě tak, jak pro Weigertovu metodu. Po obarvení možno řezy ještě vyprati v 0·25 % roztoku lithia carb. V zásobě máme připraveny dva roztoky.

| | |
|---------------------------|--------|
| a) Kalium hypermanganicum | 0·25 g |
| Aqua dest. | 100 g |
| b) 1. Acidum oxalicum | 1 g |
| Aqua dest. | 100 g |
| 2. Kaliumsulfat | 1 g |
| Aqua dest. | 100 g |

1. a 2. uchováme každé zvláště a před upotřebením mícháme stejné díly b_1 b_2 , při čemž hned po smíchání učitíme volnou kyselinu siřičitou. Při odbarvování jest nutno připraviti si řadu nádobek; do první dáme roztok a), do druhé a třetí nádobky vodu, do čtvrté směs roztoku b), do další vodu, do poslední nádobky 0·25 % roztok lithia carb. Při odbarvování postupujeme takto: Řez z haematoxylinu vyjmeme skleněnou jehlou a vložíme do hypermanganu, kdež se velice rychle odbarvuje, nabývá barvy červenohnědé a v malé době počne se differencovati šedá a bílá hmota. Jakmile tyto dvě hmoty

od sebe rozeznáme, řez opereme a vložíme do směsi roztoku *b*); tento roztok odbarví téměř okamžitě hypermanganem zežloutlý a oxydovaný řez. Řez nutno rychle přenést z kyseliny do vody a dále do lithia, kde nabude modročerné barvy. Při správném odbarvení zbývá jen černé zbarvení nervových vláken s pochvou dřevnou, vše ostatní jest úplně bezbarvé. Po lithiové lázni se řezy vyperou ve vodě a montují přes xylol do kanady.

Někdy se stává, že řezy po vyprání v kyselině vykazují červeno-rezáté skvrny. Tu nutno vložit řez nazpět na krátkou dobu do hypermanganu a z něho opět do kyseliny. Metoda tato, která vyžaduje velkého cviku, dává dobré výsledky. Řezy po této metodě možno ještě dodatečně barvit, buď karmin-kamencem na jádra, nebo Giesonem; tu obdržíme vazivo tmavě červené, osově váleč červené, glii růžově zabarvenou.

Schnitzler J. C. (Neurolog. Centralblatt 1913).

Technika barvení nervů s pochvou dřevnou.

Modifikace Palovy metody, které možno použít hlavně tehdy, když materiál nebyl již předem dostatečně chromován.

Celloidinové řezy (po Müllerově tekutině) vloží se do 2.5% dvojchromanu dras. na tři dny. Dobře se operou ve vodě a vloží se do Weigertova haematoxylinu na 12—24 hodin. Differencování provádí se na dvakráte, nejdříve nutno provést předdifferencování, které záleží v tom, že se řezy opláchnou ve vodě a vloží se do směsi

| | |
|--------------------------|---------|
| 2% červená krevní sůl | 10 dílů |
| Lithium carbonicum conc. | 30 „ |

(před upotředením promíchat). Předdifferencování jest ukončeno, když prázdný kraj celloidinu jest bezbarvý, což trvá asi 1 minutu.

Řezy se důkladně omyjí a vloží do 2. 5% dvojchromanu na 30 vteřin, po tom se důkladně operou a přenesou se ke konečnému differencování dle Pala do kalium hypermang. 1 : 600. Vybilení:

| | |
|-------------------------------|--|
| 1% kys. šťavelová | |
| 1% siřičitan sodn. aa p. aeq. | |

Výhody této metody spočívají v tom, že základní ton jest stejnoměrně bílý, celloidin úplně průsvitný, ne-

utrální zona úplně odbarvena, aniž by trpělo zbarvení nervů. Špatně chromované preparáty dávají dobrý výsledek, ačkoli tam obyčejné metody úplně selžou.

Kultschický barví řezy po fixaci materiálů v tekutině Erlickyho kyselým haematoxylinem.

| | |
|------------------------|-------|
| Haematoxylin cryst. | 1 g |
| alkohol 96% | 10 g |
| 2% acid. acetic. glac. | 110 g |

Řezy se vypírají v koncentrovaném roztoku lithia carb. nebo natria carbon. Mnohem lépe se řezy differencují, přidá-li se k 10% lithiu carb. 1% roztok červené krevní soli, a ponechají-li se v tomto roztoku po několik hodin.

Wolters barví kyselým haematoxylinem (Kultschický), řezy ponechává 24 hodin v thermostatě a odbarvuje methodou Pal-Weigertovou.

Všechny ostatní modifikace nemají žádných zvláštních předností před Weigertovou neb Palovou methodou, se kterými možno nejlepších výsledků docílit.

Rosin. Základem jeho barvení jest trojbarevná směs dle Ehrlicha (kyselý fuchsin, methylová oranž G. a methylová zeleň). Barvu připravíme si tím způsobem, že základní substanci triacidu Biondiho (od fy Grüber, Lipsko) rozpustíme ve vodě a přidáme kysel. fuchsin.

| | |
|-----------------|--------|
| Triacid. Biondi | 0.4 g |
| Aqua dest. | 100 g. |

K této barvě přidá se 7 dílů 0.5% vodného roztoku kyselého fuchsinu (roztok I.). V této barvě se ponechají řezy 5 minut. Barví-li se řezy v celloidinu zalité, tu se přidá ke 4 dílům roztoku I. ještě jeden díl 0.5% roztoku fuchsinu kysel. (roztok II.). V tomto zůstanou řezy 1 minutu. Obarvené řezy opláchnou se v dest. vodě a přenesou se do slabé kys. octové (1 kapka acid. acet. gl. na 100 g vody), po 5—10 vteřinách omyjí se v čisté vodě a vloží do lihu, kde zůstanou tak dlouho, pokud z nich vystupují fialové vločky. Když se již neodbarvují, vloží se do xylolu a balsámu.

Barvení toto jest velice nespolehlivé; celloidin zbarví se tmavozeleně.

Fraenkel: Pro nejjemnější vlákna nervová s pochvou dřevnou v míše a mozku udává Fraenkel tuto met-

hodu: Mícha neb mozek konservují se v Müllerově tekutině, nebo ve Weigertově dvojchromanu draselnatém, kamenci chromovém.

Řezy vloží se na 6 hodin (mícha) nebo 12 hodin (mozek) do polychromové modři, při čemž běře se větší množství barvy na málo řezů. Obarvené řezy operou se ve vodě a přenesou se na ploché lžíčce do vodného koncentrovaného roztoku taninu (starší roztok působí lépe).

Odbarvování trvá delší dobu, řezy se ani za 12 hodin neodbarví, a zůstanou zde tak dlouho, až možno rozeznati šedou hmotu od bílé. Odbarvené řezy omyjí se důkladně ve vodě a barví se znovu v polychromové modři, na které se vytvoří po vložení řezů kovový povlak. Tanin v řezech po odbarvení působí po druhé na methylovou modř, kterou mnohem pevněji váže; řezy se zbarví modro-černě. Řezy, které se opětně tak dlouho barví, jako po prvé, differencují se zase taninem, operou ve vodě, přenesou do 96% alkoholu, prosvítí v oleji bergamottovém a přes xylol montují v balsámu. Pro míchu stačí dvojitý pochod 6hodinový, pro mozek 12hodinový; hlavně při druhém pochodu nesmíme jíti pod tuto dobu. Myelin zbarví se temně modře, jádra světle modře. Možno zabarviti ještě Giesonem vazivo.

B e r n a r d (Centrbl. f. Nerv. u. Psych., Bd. XVI. 893) upozorňuje, že při vyšetřování řezů mozkiem, které jsou barveny methodou Weigertovou neb Palovou, objevují se místa „miliárních uzlíků“, která vykazují zánik nervových vláken, diffusní zbarvení atd., jako by šlo o skutečná pathologická hnízda.

Barví-li se řez jinými barvami, kde nevytváří se lak chromanů, tu nalezneme sice tato místa, avšak nejsou to hnízda nádorovitá. Přichází k tomu výkladu, že jde o místěčka, která nebyla proniknuta celloidinem, chromany nebyly vázány, při všech dalších pochodech se lehce chrom v těchto místech odstranil, takže se nevytváří později lak chromanu; jiná barviva adjektivní dají v těch místech dobré zbarvení.

B e n d a. Barvení myelinu periferních nervů. Z materiálu konservovaného 10% formolem, děláme řezy po zmrznutí a ty pak barvíme Böhmerovým haematoxylinem nejméně 24 hodiny, načež odbarvujeme Weigertovou tekutinou (borax, červ. krev. sůl.). Preparát úplně od-

barvíme, omyjeme ve vodě, vložíme do alkoholu, pak do kreosotu, který se xylolem odbarví a ukládá do kanady. Touto methodou zůstanou zbarvena jen vlákna s pochvou dřehovou. V kůži zůstává zbarvená rohová vrstva epidermis právě tak, jako nervy.

M a r c h i h o methoda barvení degenerovaných nervů periferních i centrálních. (Z. f. w. Mikroskopie 1893). Material fixovaný v Müllerově tekutině přenášíme do směsi:

Müllerova tekutina 2 díly
Kyselina osmičelá (1%) 1 díl.

V této ponecháme material několik dnů, potom vypíráme ve vodě a přes alkohol zalíváme buď do celloidinu nebo paraffinu. Řezy možno barviti haematoxylinem, nebo kamencovou košenilou, nebo i dehtovými barvami jako: safraninem, gentianou a j. Jako všude, kde k fixování používáme kyseliny osmičelé, tak i zde nutno ukládati pouze malé kousky materiálu. Barvíme-li řezy celým mozkiem, můžeme ukládati řezy nejvýše 5 mm tlusté, jinak kyselina osmičelá materiálem nepronikne. Na dobře zbarvených preparátech vidíme jen místa čerstvé degenerace (t. j. dříve, než nastane úplná atrofie nerv. elementů a jich substituce gliovým vazivem) černě zbarvena.

Methody této používá se téměř výhradně při experimentálních studiích průběhu drah mozkových a mozkomíchových. Jak prokázáno, jest nejvhodnější doba ke studiu degenerace nervů asi 11 den po operaci.

Barvení osového válce v nervstvu.

Nejstarším barvením osových válců bylo ono barvení ammoniakálním karmínem, kterého se používalo pro barvení míchy a mozku vůbec. Po obarvení a montování do kanady byly zbarveny gangliové buňky červeně, pochva dřehová světle červeně, osový válec tmavočerveně. Jak již dříve uvedeno, nedostáváme nyní takového zabarvení, ovšem jiná barviva nahrazují mnohem lépe barvení karmínové.

C h i l e s o t t i udává barvení karmínové, které barví po každé fixaci.

1 g natria kyseliny karmínové (Grübler)
 0.5 g uran nitrátu,
 100 g dest. vody.

Vaří se půl hodiny, po vychladnutí se filtruje. Před upotřebením přidají se na 1 cc barvy 2 kapky kyselého alkoholu. Řezy po Müllerově tekutině zbarví se po 5 až 10 minutách, po formolu po 15—20 minutách, po tekutině Marchi-ho za 2—4 hodiny. Po zbarvení se řezy vyperou ve vodě, odvodní a přes xylol montují v pryskyřici. Přebarví-li se řezy, tu možno je v nakyseleném alkoholu odbarviti.

S t r o e b e (Zentrbl. f. alg. Path. etc. 1893, IV. Bd.).
 Methody této možno použití nejen na centrální, ale i na periferní nervstvo. Materiál fixuje se v Müllerově tekutině po dlouhou dobu (4—5 měsíců) právě tak, jako pro Weigertovu metodu. Po odvodnění v alkoholu se zaleje do celloidinu, řezy mají býti tenké as 10 μ . Barvení se provádí takto:

1. Řezy vloží se do anilinové modři (nasycený vodný roztok) asi na 10 minut až 1 hodinu; obarví se temně modře.

2. Řezy operou se nejdříve v dest. vodě, nato se differencují v abs. alkoholu s přidáním 20—30 kapek 1 % roztoku kal. causticum v alkoholu (100 cc alkoholu 1 g kali caustic. nechá se státi 24 hodiny, načež se filtruje).

3. V tomto alkalickém alkoholu změní řezy ihned barvu do červena, při tom odcházejí obláčky barvy červenavé. Odbarvování trvá tak dlouho, až přejde barva řezů do světlohnědočervena (u řezů tlustších do tmavohněda) a nevystupují již žádné obláčky barevné z řezů, což trvá 1 až několik minut.

4. Po odbarvení přenesou se řezy do většího množství dest. vody as na 5 minut, zde nabudou řezy opět barvy světle modré.

5. Řezy obarví se barvou kontrastní, a to safraninem. Koncentrovaný roztok safraninu rozředí se na polovinu vodou, kde ponechají se řezy $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ hodiny, načež se odbarví v alkoholu. Montování přes xylol do kanady. Osové válce modré, jádra červená.

Mallory barví osové válce ve vláknech centrálního nervstva v roztoku:

- 1.75 g haematoxylini crystal.
- 10 cc kyseliny fosformolybdenové 10%
- 200 cc dest. vody
- 5 g karbolové kyseliny.

Po přípravě musí barva státi několik týdnů, nežli uzraje. Odbarví se jen ve vodě, přes alkohol, xylol do kanady. Vedle osových válců barví se i vazivo.

W o l t e r s (Zeitschr. f. wiss. Mikr., Bd. VII. 1890) barví řezy z materiálu v tekutině Kultschickýho fixovaného a v celloidinu nebo paraffinu řezané, takto: Řezy se uloží do mořidla.

- 1 díl 10% roztoku chlorvanadia,
- 4 díly 8% aluminiumacetátu

na 24 hodin, vyperou se as po 10 minut ve vodě a vloží se do roztoku haematoxylinu:

- 1 g haematox. crystal.
- 50 cc kyseliny octové 2%.

Tmavě zbarvené řezy přenesou se a odbarvují se v kyselém alkoholu ($\frac{1}{2}\%$ kyselina solná), až nabudou barvy modročervené. Vypírati v čistém alkoholu tak dlouho, až se kyselina odstraní. Přes origanský olej montovati do balsámu. Jen osové válce zůstanou tmavě zbarveny.

K a p l a n (Arch. f. Psych. u. Nerv. Kr. XXXV. 1892.)

1. Materiál centrálního nervstva fixuje se po delší dobu (3 měsíce) v Müllerově tekutině; mohla předcházeti i fixace formolem.

2. Tvrzení v alkoholu, a to po 24 hodiny v 80% a 24 hodiny v 96%.

3. Zalití materiálu do celloidinu nebo paraffinu. Řez musí se zhotoviti pokud možno brzy, by materiál neležel dlouho v alkoholu. Barvení děje se čerstvě připraveným roztokem.

4. 10% anthracen-železito-duběnkový inkoust (z Leonhardiho továrny v Drážďanech — Grübler Lipsko), po 3 dny v thermostatu při 30° C. Řezy možno ponechati i déle v barvě, jest pouze nutno občas řezy promíchat, aby se neslepily.

- 5. Krátké omytí řezů vodou a differencovati
- 6. v odbarvovací tekutině Pal-Weigert.

7. Po odbarvení preparát dobře opláchneme ve vodě, jako kontrastního barviva použijeme slabého roztoku kyselého fuchsinu.

8. Po odvodnění montujeme řezy přes xylol do kany. Osové válce jsou zbarveny temně, glia a buňky jsou úplně odbarveny. (Ne vždy spolehlivé zabarvení, jinak dosti dobré.)

S c a r p a t t i. (Neurologisch. Centrbl. XII. 1897.) Barví řezy z centrálního nervstva, které bylo fixováno formolem, po zalití do celloidinu přímo haematoxylinem Weigertovým 5 minut, nato přeneseme po krátkém omytí řezy do kys. skalice modré, kde řezy nabudou tmavomodré barvy. Po opláchnutí řezů odbarvují se napolo v rozředěné odbarvovací tekutině dle Weigerta (borax — červená krevní sůl). Omytí ve vodě, montovati přes xylol do pryskyřice. Zbarví se osové válce, gangliové buňky, jádra vaziva a cev. Dává dosti dobré výsledky.

Chilesotti (Z. f. w. Mikr. 1902 XIX.). Barví karmínem s kyselinou solnou. Materiál konservuje ve Weigertově tekutině (dvojchroman draseln. 5 g, chromový kamenec 2 g, voda dest. 100.) Obarvené řezy redukuje slabým hypermanganem a odbarvuje 5% kyselinou sírovou, kterýžto pochod 5- až 10krát za sebou opakuje; mají se zbarviti elektivně osové válce.

Avšak autor sám uvádí, že neobdrží po každé elektivního zbarvení; v šedé hmotě se osové válce vůbec nebarví, taktéž v jádrech nervů. Substantia Rolandi jest vždy temně zbarvena. Dle vlastního názoru nemožno metodu tuto zvláště doporučovati, proto se o ní krátce jen zmiňujeme s odkazem na originální předpis.

N a b i a s (Comp. Rendu. Soc. de. Biolog. LVI. 1904.) barví řezy systému nervového chloridem zlata.

1. Řezy, podložené na podložní skélko, dobře vodou promyté, pokryjí se kapkou jodu (1 g jodu, 2 g jodkalia a 30 g vody); řez musí býti po jodu žlutě zabarven.

2. Jodovaný řez přeleje a omyje se dest. vodou.

3. Na omytý řez nakápně se 1% roztok chloridu zlata, řez ztratí ihned zabarvení po jodu.

4. Opere se znovu ve vodě a pokryje se

5. anilinovou vodou, ve které řez ihned změní barvu do fialova nebo purpurova. Po omytí přeneseme řez přes

xylol do kanady. Osové válce jsou zbarveny, někdy jsou i fibrilly znatelný. Výsledek není vždy jistý.

Impregnace osových válců stříbrem.

B i e l s c h o w s k y (Neurolog. Centrbl. XXI. 1902). Materiál centrálního nervstva fixuje se formolem 10%, po fixaci dělají se řezy ze zmrzlého materiálu. Řezy uloží se přímo z mikrotomu opět do 10% formolu a z tohoto přenesou se do ammoniakálního roztoku dusičnanu stříbrnatého, který se připraví takto: Do libovolného množství ammoniakku přidáváme 10% roztok dusičnanu stříbrnatého tak dlouho, až povstane bílá, rychle hnědnoucí sraženina, kterou nutno dalším přikapováním ammoniakku opět rozpustiti. Ze stříbra přenesou se řezy (skleněnou jehlou) do vody k opláchnutí, a ihned uloží se do 10% formolu k redukci, kde zhnědnou. Manipulaci tuto, totiž přenesení řezů do stříbra (ammoniakálního) a odtud do formolu, několikrát po sobě opakujeme, nesmíme však zapomenouti, že při každém přenesení řezů z formolu do stříbra a naopak, nutno tyto vždy důkladně ve vodě oprati. Po několikerém opakování nabyla i šedá substance míchy hnědé barvy. Takto zredukované preparáty se však v xylolu, chloroformu, terpentinu atd. odbarvují, pročež jest nutno právě tak, jako při obyčejných fotografických reprodukcích, preparáty zlatem zredukovati, čehož lehce dosáhneme přidáním několika kapek chloridu zlatového do mističky s vodou, do níž dáme trochu boraxu, po případě kyseliny octové. V této lázni nabudou řezy barvy modravé; k odstranění nezredukováného stříbra ukládají se řezy do siřičitanu sodnatého (fixační lázeň), načež se dobře omyjí a montují přes xylol do pryskyřice.

Jak řezy, tak i celé kousky míchy a mozku možno v celku impregnovati a po zalití do paraffinu řezati. Kousky v tloušťce as 1 cm fixují se ve 20% formolu, pak se přenesou do stříbrnaté lázně, kde zůstanou 1—4 dny; potom se vloží na několik minut do ammoniakku a vody 1 : 10. Z ammoniakku přenesou se materiál do formolu 10%, kde se v thermostatě při 30° C ponechá po 3 dny. Vytvoří se nejdříve bílá, pak hnědá sraženina; tehdy jest nutno tekutinu změnit. Po redukci odvodní se preparát pokud možno rychle v alkoholu a zaleje do paraffinu. V případě,

že by redukce nebyla v řezech správná, nutno řezy ještě jednou uložit do 10% formolu, ke kterému přidáme ammoniak v poměru asi 1 : 10. Po redukci stříbra nutno vložit řezy do zlaté lázně, pak montovati přes xylol do pryskyřice. Methoda tato nedávala však určitých a jasných obrazů, zbarvilo se totiž vedle válců osových též vazivo kollagenní i vlákna elastická. Vadu tuto hleděl *B i e l s c h o w s k y* (*Journal f. Psycholog. u. Neurologie* IV., 1905.) odstranit tím způsobem, že vsunul mezi jednotlivé pochody působení kyseliny. Nejlépe se osvědčuje methoda tato na řezech ze zmrzlého materiálu, avšak možno použití též řezů z celloidinu neb paraffinu.

1. Kousky čerstvého materiálu (ne tlustší 1 centimetru) fixují se v 10% formolu. Řezy po zmrznutí, nejvýše 10 μ tlusté, přenesou se z vody na 24 hodin do 2% roztoku dusičnanu stříbrnatého.

2. Po rychlém opláchnutí ve vodě přenesou se do ammoniakální stříbrnaté soli, která se vždy čerstvě připraví, a to takto: do 5 cc roztoku 10% AgNO_3 vkápneme 5 kapek čistého 40% roztoku natr. hydroxydat. Stříbro se ihned srazí na černohnědý oxid stříbra a tato sraženina se opatrným vkapováním čistého ammoniaků za stálého protřepávání úplně rozpustí. V tomto čistém roztoku obsaženy jsou rychle oxydující látky stříbra (dusičnan stříbrnato-ammonatý a kysličník stříbrnatý). Tento roztok se zředí na 20 cc vodou. V takto připraveném roztoku zůstanou řezy asi 15 minut, kde nabudou barvy tmavohnědé.

3. Řezy se přenesou do slabého roztoku kyseliny octové (5 kapek kyseliny octové na 20 cc vody). Jakmile řezy v octě zežloutnou, přenesou se

4. do redukujícího 20 % formolu a ponechají se v něm tak dlouho, dokud z nich vystupují bílé vločky.

5. Takto zredukované řezy nutno vložit ještě do zlaté lázně, čímž docílí se jasného vystoupení i těch nejmenších vláken nervových a rozliší se barevně vlákna nervová a vazivová. Osové válce jsou stejnoměrně černé, vazivo modrofialové.

Methody této možno použití též na celé kousky orgánů; tyto musí ovšem v jednotlivých tekutinách zůstat mnohem déle, a to v neutrálním stříbře ponechají se tenké kousky 3—4 dny, v ammoniakálním stříbře zůstanou

několik hodin, rovněž tak i v kyselině octové. Redukce ve formolu trvá 24 hodiny. V zlaté lázni musí zůstat 24 až 48 hodin.

Barvení gangliových buněk centrálního nervstva.

Gangliové buňky centrálního nervstva přijímají po různých fixačních tekutinách téměř veškerá barviva v histologii užívaná. Po Müllerově tekutině barví se dobře ammoniakálním karmínem a haemateiny. Po fixaci formolem, alkoholem, sublimátem etc. barví se velice intenzivně barvami dehtovými. Tento vzájemný vztah mezi fixací a barvivem, jako všude jinde, i zde dal podnět k velice četným údajům a methodám barvení. Nejdůležitější stala se v poslední době metoda dle N i s s l a (Z. f. wiss. Mikr. 1895, 1896).

Čerstvý materiál ukládá se do 96% alkoholu. Řezy zhotoví se bez jakéhokoliv zalití a vloží se přímo z lihu do roztoku methylové modři.

15 dílů methylové modři
7 „ benátského mýdla,
4000 „ dest. vody.

Barvu takto připravenou, kterou možno v zásobě chovati, nalejeme na hodinové skélko, řezy vložíme do barvy, kterou zahříváme nad lihovým kahanem tak dlouho, až začne vystupovati pára (65—70°). Z barvy přeneseme řezy do odbarvovací tekutiny:

1 díl čistého anilinového oleje,
9 dílů alkoholu 96%,

kde ponecháme je tak dlouho, až nevystupují již žádné barevné obláčky. Nyní vyjmeme řezy lopatičkou na podložní skélko, osušíme je ssacím papírem a nakapeme na ně olej c a j e p u t o v ý, který opět papírem vysušíme; potom nakápneme na vysušený řez benzin, který jej ihned prosvětlí a pak benzin-kolofonium. Nad plamenem tuto kapku rozehrějeme, benzin se vypaří, a položíme konečně krycí skélko, které nutno opatrně přitlačit. Gangliové buňky jsou velice intenzivně zbarveny, u nich vystupuje velice ostře t. zv. tigroid (nesprávně Nisslova tělíska), ostatní jádra vaziva, cev atd. jsou též zbarvena.

Tato původní metoda Nisslova jest dosti obtížná, docílilo se však po velkých úvahách toho, že možno k témuž výsledku dojíti i jednodušší cestou po zalití

materiálu do celloidinu nebo paraffinu a montování do kanadské pryskyřice.

V a n G e h u t c h e n. Řezy z materiálu, který byl zalit do paraffinu, přilepíme vodou na podložní skélko, po odstranění paraffinu vložíme skélko do roztoku methylové modři dle Nissla a po projití xylolem uložíme je do damarské pryskyřice.

M a n n, (Z. f. w. mikroskop. 1894) barví směsí

1. 2 díly 1% vodního roztoku methylové modři,
- 9 dílů 1% eosinu,
- 20 dílů vody dest.;

po odbarvení řezů differenceuje tyto v slabě alkalickém absolutním lihu.

2. Dle jiné metody barví řezy z paraffinu nejdříve 1% vodním eosinem, potom $\frac{1}{2}\%$ toluidinovou modří, nebo 4% methylovou modří. Odbarvuje se alkoholem.

L e n h o s e k: Material fixuje 50% formolem po dva dny, kousky přenese do abs. lihu, taktéž na dva dny, zalije do paraffinu a řezy barví as 5 minut v konc. roztoku thioninu. Řezy differenceuje v alkohol-anilinu (9 dílů alkoholu, 1 díl anilinového oleje) a montuje přes xylol neb cajeputový olej do balsámu.

M a r t i n o t t i (Z. f. w. Mikr. 1884) barví řezy as po dvě hodiny až i několik dní v nasyceném roztoku n i g r o s i n u v koncentrovaném roztoku kyseliny pikrové, po obarvení promývá řezy směsí 2 dílů alkoholu a 1 dílu kyseliny mravenčí tak dlouho, až se differenceuje šedá hmota od bílé. Montování přes xylol do kanady. Podobné zbarvení obdržíme po barvení blue-black. Řezy barví se v $\frac{1}{4}\%$ roztoku as 1 hodinu neb v slabém roztoku 1 na 3000 po 24 hodin. Výsledek barvení závisí od hmoty původního barviva. Differenceování pouze alkoholem, montování přes xylol do kanady.

G a n g l i o v é b u ň k y s p i n á l n í po obyčejném tvrzení v alkoholu se velice svaští; má-li se zachovati jich vzhled normální, udává **G e h u t c h e n** tuto fixační metodu (t. zv. **G i l s o n o v a** tekutina):

| | |
|--------------------|--------|
| kys. dusičná (46%) | 15 cc |
| kys. octová ledová | 4 cc |
| sublimát | 20 g |
| alkohol 60% | 100 cc |
| voda dest. | 880 cc |

Po fixaci promývá se materiál 1 hodinu v tekoucí vodě, přenesení do alkoholu s jod-jodkali. Barví se tolluidinem, differenceuje 94% alkoholem.

G o l g i h o m e t h o d a.

Tato metoda impregnace gangliových buněk a jejich výběžků spočívá na srážení stříbra s dvojchromanem draselnatým. Materiál, pokud možno nejčerstvější, dlužno uložit do Müllerovy tekutiny nebo do tekutiny Erlickiho, po případě do 2% dvojchromanu draselnatého. Jest velice těžko udati, jak dlouho nutno ponechat materiál (jen malé kousky) ve fixační tekutině; dle údajů jest nejlepší doba 20 dnů v době letní (nebo za tepla), delší v zimě. *Heli* injikuje dvojchroman hned po smrti zvířete přímo z aorty. Po utvrzení vložíme materiál do slabého roztoku AgNO_3 , ve kterém nastane ihned červenohnědé srážení stříbra. V tomto roztoku materiál omyjeme a přeneseme jej do čistého 1% roztoku AgNO_3 . Impregnace docílíme asi po dvou dnech, necháme-li materiál v roztoku stříbra na teplém místě státi. Doporučuje se časem se přesvědčiti na řezech z volné ruky a kontrolou pod mikroskopem, zda reakce již nastala. Stalo-li se tak, dlužno kousky materiálu dobře alkoholem promýti, aby se odstranilo veškeré stříbro. Materiál řežeme bez zalití, řezy přenášíme přes alkohol do kreosotu, dále do terpentínového oleje, do balsámu. Preparát nepřikryjeme krycím skélkem, jelikož by se impregnace po krátkém čase ztratila.

I u této metody nalezneme řadu modifikací, týkající se hlavně fixace, tak přidává se ke dvojchromanu kyselina osmičelá, jindy opět formol atd.

Nutno upozorniti, že jest to metoda naprosto nespolehlivá; nesráží-li se někde stříbro, to neznamená, že v těch místech není nervstva. Na podařených preparátech jest velice dobře a jasně viděti gangliové buňky, výběžky etc.

Též metody možno upotřebiti k impregnaci žlučovýchodů (kapillár) v játrech, vývodů ve žlázách atd.

Vyšetřovací metody na neurofibrilly.

B e t h e (Arch. f. wissensch. M. 1900, XVII., Arch. f. m. Anat. 1900). Dříve než někdo počne podle této metody pracovati, jest naprosto nutné, aby se seznámil s originálním sdělením. Metoda tato v pravém slova

smyslu zvířila dobu vyšetřování neurofibrill. Bylo vytýkáno autoru, že metodu uveřejňuje čistě z osobních pohnutek. Jak sám praví, uveřejňuje metodu svoji proto, aby umlčel protivníky; avšak metoda ta jest naprosto nespolehlivá, a jak sám uznává, nikomu z modifikátoru se asi nepovede, byť i jen náhodou, zdokonaliti ji tak, aby toto barvení bylo naprosto jisté. Přece jest však možno při velké trpělivosti dosíci obrazů velice instruktivních, avšak pouze jen na materiálu normálním; naprosto nevhodnou jest tato metoda pro materiál pathologický.

I. Metoda pro materiál nervstva obratlovců.

A. F i x a c e.

Čerstvý materiál nutno nařezati v ploténky 4—10 mm tlusté a vložit je do 3—7.5% kyseliny dusičné (spec. váhy 1.40), kde se občas obracejí, a ponechati je v ní 24 hodiny. Materiál taktoz nitrovaný musí nabýti světlou žluté barvy; tmavožlutý materiál (silně znitrovaný) jest naprosto nepotřebný.

B. T v r z e n í.

Z kyseliny dusičné přeneseme materiál přímo do 96% alkoholu na 12—24 hodin, delší ponechání v alkoholu nevdí.

C. V y m y t í k y s e l i n y.

Z alkoholu přeneseme kousky na 12—24 hodiny do směsi

| | |
|---------------------------------|--------|
| ammoniak (spec. váha 0.95—0.96) | 1 díl |
| vody dest. | 3 díly |
| alkoholu 96% | 8 dílů |

Po vymytí přijdou kousky opět na 6—12 hodin do alkoholu 96%.

D. K y s e l ý a l k o h o l.

| | |
|---|------------|
| Kyselina solná (spec. váha 1.18 = 37% B.) | 1 díl |
| voda dest. | 3 díly |
| alkohol 96% | 8—12 dílů. |

V této tekutině ztratí materiál žluté zbarvení, stane se téměř bílým; odtud přeneseme se opět do alkoholu na 12—24 hodiny.

E. Přenesení materiálu do vody ne déle než na 2 až 6 hodin.

F. Molybdenování.

Kousky přenesou se do 4% roztoku Ammonium molybdatu (Ammonium molybdenicum) na 24 hodin. (Preparát Ammon. molybd. bílý, ve velkých krystalech jest mnohem lepší než preparát žlutý v malých krystalech.)

G. Zalití.

Kousky materiálu se rychle omyjí v dest. vodě přenesou se do alkoholu 96% na 10—24 hodin, dále do absolutního alkoholu a přes xylol neb chloroform do parafinu (ne do celloidinu). Teplota od A—E musí býti as 20° C.

Pro barvení fibrill 8—15° C pro barvení Golgiho pletení 18—30° C, nikdy však větší.

H. Hotovení řezů děje se v paraffinu a přilepí se Mayerovým glicerín-bílkem na podložní skélko. Přilepené řezy přenesou se, jako obyčejně, přes xylol a alkohol na krátkou dobu $\frac{1}{2}$ —1 minuty do vody. Nejlepší tloušťka řezů jest 10 μ .

J. Differencování a barvení tvoří nejtěžší část této metody, poněvadž nutno pro každý kousek připraveného materiálu a pro každý druh buněk vyzkusiti dobu barvení i differencování. Skélko s řezy omyje se ještě jednou destilovanou vodou, aby všechen alkohol byl odstraněn, a opatrně se čistým hadříkem na stranách a zespodu osuší. Potom pipetou nakapeme na řezy dest. vodu as 1—1.5 cc, položíme do thermostatů 55—60° C, ne déle než 5—10 minut. Pak vodu slejeme a nakapeme na řezy roztok tolluidinové modři (1 díl na 3000 vody). Podložní skélko dáme opět do thermostatů na 10 minut, načež se barva dest. vodou omyje a skélko vložíme do 96% alkoholu. Veškeré barvivo, které není vázáno na molybden, se v alkoholu rozpustí v modrozelené barvě. Neodcházejí-li již barevné vločky, vložíme skélko do absol. lihu, do xylolu a konečně přikryjeme řezy kanadskou pryskyřicí.

Řezy z mozku differencují se asi po 2—6 minutách, z prodloužené míchy 3—7 minut, z míchy 5—10 minut. V celku jsou dobře differencované preparáty fialové neb červenofialové. Pro bezobratlovce udává Bethe konservování ve směsi 3 dílů koncent. kysel. pikrové a 1 dílu koncent. pikranu ammonatého, načež se ihned kousky vloží do molybdenu. I bez dalšího differencování barví se

fibrilly n e u r o p i l u; buňky gangliové barví se po molybdenu velice sytě.

C a j a l S. R. (Z. f. wiss. M. XX. 1903). Methoda na vyšetřování neurofibrill osových válců a zakončení nervů po impregnaci stříbra.

Methoda tato spočívá na imbibici dusičnanu stříbrnatého a na redukcí stříbrnaté soli v neutrálním roztoku hydrochinonu nebo pyrogallolu.

Material nutno vložiti do roztoku AgNO_3 0·75—3% a ponechati v teple při 30—35° C. Tato teplota jest nutna, má-li se docíliti dobrého výsledku; v létě možno nechati materiál při teplotě pokoje, musí však býti teplota vyšší než 22° C. Při nižší teplotě jest nutno materiál ponechati po delší dobu v roztoku.

Důležitá jest koncentrace roztoku, a pravidelně se stává, že čím slabší roztok, tím lépe barví se fibrilly oproti světlé půdě; čím koncentrovanější roztok stříbra, tím méně vyniknou fibrilly, ale tím více jiné elementy (buňky jsou lépe konservovány, zvláště pak A u e r b a c h o v y konečné pupeny). Malé objekty, jako kousky míchy králíka, zůstanou 2½—3½ dne ve stříbre. Ponechání materiálu po delší dobu kazí výsledek. Větší objekty zůstanou poměrně déle v roztoku, as 4 dny. Dobu „zrání“ jest nutno vždy zkusmo vyšetřiti, jelikož nedá se předem určit.

I. Ve většině případů užívá Cajal 1·5% roztok dusičnanu stříbrnatého v destilované vodě. Docílí dobré impregnace fibrill, nukleolů i zakončení nervů. 0·75 až 0·5% roztoku užívá při impregnaci materiálu embryonálního nebo novorozených zvířat, 3% roztok používá u materiálu od člověka a velkých ssavců; v něm impregnují se fibrilly a pericellulární rozvětvení. 5—6% roztok používá se při vyšetřování bezobratlovců, kde se hlavně dobře impregnují A u e r b a c h o v y pupeny.

R e d u k c e. Preparáty omyjí se as po 2 minuty ve vodě a uloží se na 24 hodin do roztoku

| | |
|------------------------------------|-------|
| hydrochinon (neb pyrogallová kys.) | 1—2 g |
| voda dest. | 100 g |
| formol | 5 g |

Po redukcí se materiál řádně ve vodě opere po několik minut a uloží do alkoholu a zalévá do celloidinu

(paraffin není vhodný). Řezy musí býti tloušťky 10—30 μ a montují se do kanadského balsámu.

II. Methoda barvení osových válců a neurofibrill v gangliových buňkách.

Drůvější methoda nebarví vůbec osových válců. Necháme-li však stříbro účinkovati na tvrzený materiál, a to v alkoholu čistém neb ammoniakálním, barví se osový válec, zářezy Ranvierovy, vidlicovité rozdělení nervů atd.

1. Fixování materiálu po 24 hodiny v 96% lihu.

2. Materiál vypírá se po několik hodin v dest. vodě a vloží se do roztoku stříbra.

| | |
|------------|-------|
| Arg. nitr. | 1 g |
| voda dest. | 100 g |

Uloží se v thermostatu při 30—35° C; po impregnaci se materiál vymyje, zbaví přebytečného stříbra a uloží do roztoku:

| | |
|-------------|-------|
| hydrochinon | 2 g |
| voda dest. | 100 g |
| formol | 5 g |

3. Materiál dobře propláchneme vodou, uložíme do alkoholu a zaléváme do celloidinu. Osově válce hnědo-černé, neurofibrilly velkých buněk červenohnědé.

Preparáty nařezané mohou se ještě ztemnit a ustáliti zlatou lázní.

| | |
|-----------------------|-------------------|
| Ammonium sulfocyanat. | 3 g |
| Natr. subsulfuros. | 3 g |
| Auri chlorat. | 1% několik kapek. |

Preparáty se vyperou, vloží do alkoholu a montují do kanadského balsámu.

III. Barvení neurofibrill velkých buněk a jemných nervových vláken.

1. Materiál fixujeme v ammoniakálním alkoholu:

| | |
|-------------|-----------|
| alkohol 97% | 100 cc |
| ammoniak | 0.5—1 cc. |

Pro větší kousky možno zvýšiti procento ammoniaků na 1.5, nebo se ponechá materiál v ammoniakálním lihu déle, as 2 dny; nejlépe se osvědčilo tvrzení po 24—36 hodin.

2. Preparáty se dobře dest. vodou omyjí a uloží do 1.5% roztoku arg. nitrici. Redukce táž jako sub. II. udáno.

Bielschowsky M. (Neurolog. Centrbl. XXII. 1903). Impregnace neurofibrill nitrátem stříbra. Modifikace metody, uveřejněné 1902 (viz dříve).

1. Orgány fixují se 12% formolem (který jest rozředěn studničnou vodou!). Orgány mají se vzíti po sekci za 24 hodin; jest úplně lhostejno, provádí-li se impregnace ihned nebo později, třeba po letech.

2. Řezy zhotoví se na mikrotonu po zmrznutí, nemají býti tlustší než 20 μ .

3. Řezy přenesou se skleněnou jehlou do 2% roztoku arg. nitr. v dest. vodě. Pochvy dřevové obarví se ihned na hnědo (přenesou-li se řezy do roztoku chromové soli, obdržíme trvalé zbarvení pochvy dřevové na nervech).

4. Připraví se 3% roztok ammoniaků, do kterého přenesou se řezy skleněnou jehlou; nitrát stříbrnatý se ihned přemění na argentum diammonium-nitrát, při čemž se řezy žlutavě zbarví.

5. Řezy vloží se na 10 minut do 20% formolu.

6. Řezy se namočí jen na krátkou dobu do 3% ammoniaků a

7. přenesou se do 0.5% roztoku dusičnanu stříbra, kde se stříbro ihned srazí. Roztok tento nutno po krátkém upotřebení vyměnit. Zde zůstanou řezy, až nabudou hnědé barvy, což trvá as 1/2 minuty, načež se vloží do 20% formolu, kde nastane redukce, jevící se ve vystupování bílých vloček.

8. Řezy přenesou se k další redukci do 3% ammoniaků a nakonec ještě do 20% formolu, kde úplně ztmavějí.

Řezy takto zbarvené vkládají se do zlaté lázně; na 10 cc vody dají se 2—3 kapky 1% chloridu zlatnatého, k čemuž se přidá několik kapek kyseliny octové. V roztoku zlata změní řezy barvu hnědožlutou na tmavě fialovou; k odstranění nezredukovaného stříbra vyperou se řezy v kyselé lázni fotografické, která se rozředí; řezy se potom důkladně promyjí, odvodní a montují do kanadského balsámu.

Veškeré tyto impregnační metody vykazují mnoho vad, nejsou spolehlivé, dávají však dosti instruktivní, hlavně demonstrační preparáty; pro patologický materiál jsou ovšem naprosto nespolehlivé.

Neuroglia.

Weigert. Methoda na barvení neuroglie v nervstvu u člověka spočívá:

1. na tvrzení centrálního nervstva.
2. moření oxydujícími sloučeninami kovů,
3. na redukci těchto sloučenin, a konečně
4. na barvení.

Malé kousky, nejvýše as 5 mm tlusté, uloží se do 10% formolu na 4—5 dnů, při čemž se formol vymění. Potom se přenesou do směsi

5% octanu měďnatého,
5% kyseliny octové ledové,
2.5% kamence chromového.

(Ve 100 cc vařící vody rozpustí se za stálého míchání 2.5 g kamence chromového, přidá se kys. octová a nakonec teprve octan měďnatý — v jiném pořadí se obdrží hustá, zelená sraženina.)

V této tekutině zůstanou kousky 4—5 dnů, načež se omyjí ve vodě, vloží do alkoholu k odvodnění a zalejí do celloidinu. Řezy celloidinové vloží se za příčinou oxydace na 10 minut do 1/3% roztoku hypermanganu, načež se důkladně omyjí a uloží do redukční tekutiny.

| | |
|---------------|--------|
| Chromogen | 5 g, |
| kys. mravenčí | 5 cc, |
| vody dest. | 100 cc |

Před upotřebením na 90 cc tohoto roztoku přidá se 10 cc roztoku natriumsulfatu 10%. V této tekutině se řezy, které byly nadmanganem žlutě zbarveny, po málo minutách úplně odbarví.

Barvení takto zredukovaných řezů se provádí takto: Připravíme za horka koncentrovaný roztok methylové violeti v 70—80% lihu; po vychladnutí sleje se rozpuštěná barva, do které přidá se 5% oxalová kyselina (na 100 cc barvy 5 cc kyseliny). Dále se připraví koncentrovaný roztok jodu v 5% jodkaliu, a odbarvovací tekutina;

Anilinový olej,
xylol aa part. aeq.

Řez zredukovaný (po chromogen-kyselině) se dvakrát vypere ve vodě, položí na podložní skélko, kde se řádně rozprostře; voda se rychle papírem vyssaje a na

řez nakápne methylová violeť. Zbarvení nastane okamžitě. Barva se papírem na řez přiloženým odstraní a na tento nakápne se jod-jodkalium, ve kterém fialový řez ihned zhnědne. Jod-jodkalium odstraníme opět filtrovacím papírem, řez dobře vysušíme tím, že naň položíme několikrát složený filtrační papír, který přitlačíme na řez a přejíždějice několikrát prstem po papíře, odstraníme úplně všechnu vodu z řezu. Na vysušený řez nakapeme anilin-xyloľ, ve kterém se řez počne odbarvovati. Směs olejů vyměňujeme tak dlouho, pokud se tekutina barví, načež přelijeme řez čistým xylolem a montujeme do kanadského balsámu. Byl-li řez řádně obarven, tu nalezneme vlákna neuroglie modrá, tělo buněk žluté, jádra bunečná tmavě fialová. Vazivo má zůstatí úplně bezbarvé. Metoda ta jest dosti obtížná a zároveň nejistá. Jak autor sám udává, hodí se jen pro lidský materiál, nikoliv však pro materiál zvířecí.

Impregnace chloridem zlatnatým.

Periferní nervstvo, zakončení nervů ve svalech, v epithelu atd., jest možno impregnovati solemi zlata, kde se zbarví hlavně osově válce nervů s pochvou dřevnou, jakož i vlákna bez pochvy dřevné. Soli zlata, jichž možno použití, jsou různé; zřídka používá se čistého chloridu zlatnatého $AuCl_3$. Používaný chlorid zlatnatý jest podvojná krystalická sůl s přísadou kuchyňské soli, který má asi 25% kovového zlata. Aurum chloratum fuscum ($AuCl_3 + H_2O$) má asi 53%, Aurum chloratum flavum ($AuCl_3 \cdot H + 4H_2O$) 48% kovového zlata. Tyto preparáty nemají obsahovati žádné kuchyňské soli, jen vodu a kyselinu solnou.

Veškeré však t. zv. čisté soli zlata, jak v obchodě přicházejí, mají více než 14% soli kuchyňské.

Metoda impregnace spočívá hlavně na redukcí chloridu zlatnatého v kyselém prostředí. Údaje, pokud se týkají druhu kyseliny, jakož i koncentrace, jsou velice různé.

Rovněž jsou různá mínění autorů o tom, zda dlužno k impregnaci solemi zlata použití materiálu úplně čerstvého, či použití materiálu poněkud odumřelého.

D r a s c h (Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk.) uvádí náhled, že jest nejlépe použití materiálu, který alespoň

24—48 hodin po odumření ležel ve chladu, a myslí, že právě vytvoření se kyselých reakcí v orgánu posmrtně uloženém, připraví se materiál tak, jako se děje vložním čerstvého materiálu do různých organických i neorganických kyselin.

Nejstarší předpis jest od R a n v i e r a, který použil šťávy citronové.

1. šťáva citronová, 2. chlorid zlatnatý, 1 gr. do 100 ccm vody destill., 3. kyselina mravenčí, 25 ccm v 75 ccm dest. vody. Šťáva z citronu vytlačená se procedí a do ní vloží se materiál, na př. kousek příčně pruhovaného svalstva as na 5—10 minut; potom opláchne se rychle v dest. vodě a vloží do 1% vodního roztoku chloridu zlatnatého, kde ponechá se 20—30 minut, totiž tak dlouho, až se objekt zbarví citronově žlutě, načež se přenese do rozředěné kyseliny mravenčí ve vodě 1 : 3. V této ponecháme materiál as jeden den (ve tmě!), po kteréžto době nastala redukce zlata. Materiál se zbarví růžově neb fialově modře, vlákna nervová jsou temně fialová. Materiál možno utvrditi v lihu a obvyklým způsobem zhotoviti trvalé preparáty, neb uložití do glycerinu a rozvlákniti.

C o n h e i m:

1. Chlorid zlatnatý 1 g
voda dest. 2000 ccm
kyseliny solné 30 kapek.
2. Alkoholu 96% 50 ccm
kyseliny mravenčí 50 ccm

Materiál uloží se nejdříve do roztoku chloridu zlatnatého, až se zbarví do žluta, načež se ihned přenese do alkoholu s kyselinou mravenčí, kde dojde k redukci.

L ö w i t:

1. kyseliny mravenčí 50 ccm,
vody dest. 50 „
2. chlorid zlatnatý 1 g
vody destil 100 ccm.

Malé kousky čerstvého materiálu vloží se do kyseliny mravenčí (1) a ponechají se v ní tak dlouho, až jsou průsvitné, načež se vloží do (2) chloridu zlatnatého, necháme je na tmavém místě as 15—20 minut, a pak je přeneseme do 1 roztoku k redukci, kde se ponechají as 24 hodin

načež se k další redukcí přenesou do koncentrovaného roztoku kyseliny mravenčí. Prohlížíme trhané preparáty v glycerinu.

K ü h n e vkládá materiál do tekutin jako L ö w i t, ale redukuje ve směsi:

glycerin 50 ccm
voda dest. 50 ccm
kyselina mravenčí 20—25 ccm,

R a n v i e r:

1. chlorid zlatnatý 1 g
voda dest. 100 ccm
kyseliny mravenčí 25 ccm
2. voda dest. 100 ccm
kyselina octová ledová 10 kapek.

Směs 1. se vaří, načež se nechá vychladnouti; do ní vložíme menší kousky materiálu a ponecháme je tam tak dlouho, až jsou průsvitné a zežloutly; potom je přeneseme do (2) slabě okyselené vody, kdež nastane za 1—2 dny redukce (zbarvení červenomodré.)

P r i t s c h a r d udává velice dobrou redukční tekutinu:

Amylalkohol 1 ccm
kys. mravenčí 1 ccm
voda destil. 98 ccm.

Jiných předpisů redukčních tekutin nalezneme ještě velkou řadu; tak používá se slabého roztoku kyseliny solné, kyseliny šťavelové nebo kyseliny chromové 1 : 5000 až 1 : 10.000; kys. arsenové a j. více. Z uvedeného vysvítá, že možno použití po žlutém zbarvení preparátu chloridem zlatnatým různých redukčních tekutin, které musí obsahovati vždy nějakou kyselinu. Jak uvedeno, tato impregnační metoda jest velice nejistá, leč povede-li se, dává velice poučných preparátů.

Avšak značně lepších výsledků v barvení osových válců, průběhu vláken nervových bez dřené a jich zakončení, obdržíme tak zvanou methodou E h r l i c h o v o u; je to barvení vláken nervových za živa methylovou modří.

E h r l i c h zavedl nastříkávání čisté methylové modři rozpuštěné ve fyziologickém roztoku do cev, načež vyšetřoval za čerstva a našel vlákna nervová, vlastně jich

osové válce, intensivně modře zbarvena. Jako každá jiná metoda, tak i tato doznala ihned mnoho modifikací a zároveň bylo prokázáno, že není to skutečné barvení za živa, nýbrž, že možno i po smrti, pokud materiál jest čerstvý a pokud nepřišel do styku se žádnou jinou tekutinou: vodou, alkoholem atd., barvení toto se zdarem provést. Pokud koncentrace barvy se týče, jest udáno velice mnoho různých předpisů. Někteří autoři používají velice koncentrovaných, jiní opět velice zředěných roztoků.

K injekci za živa použitá modř musí býti úplně čistá bez chlorzinku, tak zvaná medicinská modř methylová, a nejvhodnější roztok k vstřikování jest asi tento:

čisté medicinské methylové modři 1 g
0.5% roztok soli kuchyňské 200—300 ccm.

Po vstříknutí do cevy nechá se materiál ležeti as $\frac{1}{2}$ —1 hodinu na vzduchu, po kteréžto době možno pak za čerstva materiál prohlížeti ve fyziologickém roztoku, nebo v humor aquaeus, nebo i v jiné indiferentní tekutině. Prohlížíme tímto způsobem barvené tenké blány nebo preparáty trhané. Nutno uvést, že s počátku vidíme velice krásně zbarveny elementy nervové v preparátě pod krycím sklíčkem uložené, avšak po krátké době se úplně, téměř před očima, barvení ztrácí; pozvedneme-li krycí skélko a necháme-li preparát volně na vzduchu, tu opět nabude dřívějšího zbarvení. Preparáty po methylové modři možno jen velice nesnadno udržeti. Jako fixační tekutiny používá se p i k r a n u a m m o n a t é h o, kde změnění se barva modrá do hněda až černá, avšak preparáty nikdy nejsou tak pěkné, jako na čerstvém materiálu. Hodláme-li zachovati preparát pro delší dobu, vkládáme materiál do směsi glycerin-pikranu ammonatého a pak uschováme v čistém glycerinu.

Kreibisch K. (Berliner Klim. Wochenschr. 1913). Rongalitová běl (Rongalit weis) Unnou zavedena jest směs redukované methylové modře rongalitem a má velikou schopnost barvení osových válců. Jest mnohem lepší než samotná methyl. modř E h r l i c h o v a.

Roztok 0.5—0.2% barví jemná vlákna. Vstříkne-li se tento roztok do veny ušní u králíka, možno za 10—60 minut prohlížeti čerstvě zhotovené řezy, kde jsou vlákna nervová a osová válce zbarveny. 2 cc 1% roztoku nastříhnutého do dutiny břišní, vykazují za 1 hodinu dobře

zbarvené nervy. Rohovkové nervy možno posmrtně zbarviti, vložíme-li rohovku do roztoku 0·3% (asi tři kapky na 50 cc NaCl). Nastříkneme-li žábě intravitálně do břicha 0·5—1% roztok, najdeme při vyšetřování dobře zbarvené nervstvo. Konservovati možno v 5% vodním roztoku Ammoniummolibdenátu, doba tvrzení jest as 30—60 minut, pak se preparát vymyje ve vodě a přenesse přes alkohol a xylol do paraffinu.

D o g i e l (Arch. f. mikr. Anat. 1890) uvádí, že potřeba injikovati za živa, nýbrž vkládá materiál do slabého roztoku $\frac{1}{15}$ % methyl. modři, rozpuštěné buď v kuchyňské soli nebo v humor aquaeus na 10—15 minut, nechá ležeti volně na vzduchu; větší kousky ponechá delší dobu v barvě. Preparát konservuje se v pikranu ammonatém.

Dobrých výsledků obdržíme při barvení nervstva u bezobratlových, kdež možno celá zvířátka vložit do slabého roztoku modři ve vodě, neb pro mořskou faunu v mořské vodě. A p a t h y používá k barvení nervových vláken, uzlin i gangliových buněk u pijavek vodného roztoku modři v $\frac{1}{2}$ až $\frac{1}{3}$ % soli 1 : 1000 až 1 : 10.000.

V koncentrovanějším roztoku nechá materiál as 10 minut, ve slabším as 1 hodinu. Po zbarvení opírá preparát v solné vodě a fixuje pikranem ammonatým.

Jest velice těžko obdržeti z takto zbarveného materiálu řezy, a žádná z různých method se neosvědčila. P a r k e r fixoval v sublimátu, pak postupně sublimát alkohol. Jest nutno vyšetřovati pouze za čerstva!

Dlužno ještě uvést, že metoda tato nedává jen čisté zbarvení nervstva, mnohdy jsou i jiné elementy zbarveny, jako cesty, hladké svalstvo atd., ba mnohdy obdržíme obrazy, které jsou úplně shodné s preparáty, které byly impregnovány dusičnanem stříbrnatým, na př. hranice epithelových buněk atd. S. M a y e r ukládal rohovku do meth. modři a pak fixoval v pikranu ammonatém a obdržel t. zv. negativní obraz buněk v rohovce jako po stříbře.

Elastická tkáň.

Jest veliká řada různých předpisů na barvení t. zv. elasticke tkáně; M a r t i n o t t i v (Zeit. f. wissensch. Mikr. 1887 sv. 4.) uvádí velkou řadu různých zbarvení; sám udává barvení safraninem. Fixuje materiál v 0·5%

chromové kyselině, po vymytí barví v celku silně koncentrovaným safraninem: 5 g safraninu na 100 cc absol. alkoholu a 200 cc vody.

V barvě ponechá malý kousek 48 hodin a déle, načež po vyprání ukládá materiál do alkoholu a řezy z volné ruky bez zalití hotovené přenáší přes řebíčkový olej do kanady. Methoda tato dává pěkné obrazy, jest však dosti obtížná.

Později byly uvedeny mnohem jednodušší metody, na př. barvení orceinem a fuchsin-resorcinem.

U n n a. 1 g orceinu rozpustí se ve 100 cc alkoholu a k roztoku se přidá 1 cc kyseliny solné. Řezy vloží se do této barvy, kterou zahříváme na 30° C, při čemž odpaří se alkohol a barva zhoustne. Řezy vyperou se důkladně v alkoholu, až nepouštějí již barevných vloček. Elastická tkáň zbarví se temně hnědočerveně, kollagenní vazivo světle hnědě.

T ä n z e r. Tato methoda jest podobna Unnově. Orcein 0.5 g, alkohol abs. 40 cc, voda dest. 20 cc, kyseliny solné 10 kapek. Řezy ponechají se od 1—24 hodin, načež se odbarvují ve směsi: alkoholu 95% 20 cc, vody dest. 5 cc, kyseliny solné 0.1 cc, a to tak dlouho, až neodchází již žádná barva. Kontrastní zbarvení jader provádí se buď kamencovým karminem nebo modří (tolluidin, polychromová modř a j. v.).

W e i g e r t ů v elastin. Příprava tohoto barviva jest dosti obtížná a proto doporučuje se barvivo koupiti již hotové. Předpis přípravy je tento: 200 cc dest. vody, 4 g resorcinu a 2 g fuchsinu se vaří; za varu přidá se 25 cc liquor ferri sesquichlorati a vaří se ještě as 3 minuty, načež se barvivo nechá vychladnouti. Po vychladnutí roztok sfiltrujeme; na filtru zůstala vazká sraženina, kterou rozpustíme za varu (na vodní lázni) ve 200 cc alkoholu 94%; vaříme as 5—10 minut, necháme schladnouti a přidáme k barvivo tolik alkoholu, abychom obdrželi opět po vypaření objem 200 cc. Konečně se přidá 4 cc kyseliny solné. Obdržíme barvivo temně červenohnědé.

Řezy vloží se z alkoholu do barvy na 5—10 minut, načež se odbarvují libovolně dlouho v alkoholu; elastická tkáň zbarví se temně modře, vše ostatní zůstává téměř nezbarveno. Kontrastní zabarvení provádí se buď pi-

krovou kyselinou, nebo různými barvami červenými — kochenillou, karminkamencem atd. Je-li barvivo správně připraveno, pak je tato metoda úplně spolehlivá.

Kontrastní zbarvení možno provést před barvením elasticke tkáně.

Žádná z ostatních method jako Mallory, Lustgarten, Manchot, Schütz a j. nemohou se srovnati se spolehlivou a jistou methodou Weigertovou, pročez jich ani neuvádíme.

Kollagenní vazivo barví se nejlépe methodou van Giesonovou (viz níže). Vazivo kollagenní zbarví se červeně.

Unna. Barvení kollagenních vláken po Zenkerově tekutině.

Kyselý fuchsin-anilinová modř-oranž. 1% roztok kysel. fuchsinu rozředí se 10 až 20 díly vody. Řezy se as 1—3 minuty barví, načež se opláchnou a vloží do 1% roztoku fosformolybdenové kyseliny na 1 minutu. Po vyjmutí opláchnou se řezy důkladně v destil. vodě, aspoň 2krátě vyměněné, a uloží se do vodného roztoku směsi anilinové modře 0.5 g a goldorange G 2.0 gr., šťavelové kysel. 2.0 gr., destil. vody 100 kde se řezy ponechají 2—20 minut i déle. Po zbarvení důkladně odvodnit. Ku zbarvení jader možno předbarviti lithiovým karmínem. Kollagenní vlákna jsou jasně modrá; amyloid, hlen, hyalin, fibrin, protoplasma, elasticke vlákna, osově válce, neuroglia, zbarví se červeně, krvenky a dřev nervů žlutě. Rohovina svítí červeně.

Velice zajímavé jest udání v. Möllendorfovo, který uvádí ve své práci, že převrátí-li pořad, totiž odbarví-li napřed udanou směsí barev a pak vloží řezy do kys. fosformolybdenové, že dostane úplně převrácené zbarvení.

Unna. (Monatshefte f. prakt. Dermatologie XXXIV, 1902). Differenciální barvení kollagenu od substance hladkých svalů.

| | |
|------------|----------|
| Orcein | 1 g |
| Vodní modř | 0.25 g |
| Alkohol | 60.0 ccm |
| Glycerin | 10.0 ccm |
| Voda dest. | 200 ccm. |

Řezy z materiálu, který byl fixován ve směsích chromových solí, barví se nejméně po 6 hodin v udaném roztoku. Odbarvuje se nakyseleným alkoholem. Odvodní se absol. lihem, prosvítí se olejem a montuje do kanadské pryskyřice.

Mucin (hlen) barví se nejlépe v řezech thioninem. Jádra buněk modrá, mucin červený.

Ulna barví řezy v polychromové modři as 1 minutu i déle, odbarvuje v nakyselené vodě a přenese řezy na $\frac{1}{2}$ minuty do 10% vodního roztoku dvojchromanu draselnatého, vypere ve vodě a přes alkohol, xylol ukládá do kanady; mucin se zbarví ohnivě fialově, vazivo modře.

Hyalin. Řezy barví se v 2% vodním roztoku magenta (červená) — nebo v kyselém fuchsinu as 5 minut, vyperou se ve vodě a přenesou do koncentrovaného roztoku „vodní modř-tannin“, po 5 minutách se operou ve vodě a přes alkohol a xylol ukládají se do kanady. Vazivo zbarví se modře, hyalin červeně.

Fibrin barví se různými barvivy, na př. haematoxylinem, cosinem, v. Giesonem atd. Nejlépe však jest, použijeme-li speciálního barviva dle Weigerta. Barvíme as 10 minut gentianovou violetí s anilinovou vodou, napotom vypereme preparát ve vodě a osušíme filtračním papírem. Po osušení nakapeme na preparát **Lugolův** roztok, který necháme as $\frac{1}{2}$ minuty působiti, při čemž modře zbarvený preparát zhnedne; tento roztok nahnutím skélka odstraníme a opět papírem vysušíme a odbarvujeme směsí anilinového oleje s xylolem 1:2 tak dlouho, až žádné barevné obláčky z preparátu nevystupují. Je téměř vždy nutno preparáty, které mají býti Weigertovou methodou barveny, předbarviti buď košenilou nebo kamencovým nebo lithiovým karmínem. V tom případě jsou jádra zbarvena červeně, fibrin (po případě bakterie) modře.

Fraenkel doporučuje **Bestův** karmín pro barvení fibrinu, který se připraví takto:

| | |
|------------------|---------|
| Karmín Naccarate | 0.5 gr |
| Ammon. chlorat. | 1.0 gr |
| Lithium carbon. | 0.25 gr |

po důkladném rozetření dá se směs do 25 ccm vařící destil. vody. Po vychladnutí se přidá: Liquor ammon. caustic.

10 ccm a druhého dne se filtruje. Preparáty musí býti fixovány a tvrzeny v absol. alkoholu.

P r ů k a z ž e l e z a v ř e z e c h. (Stoeltzner-Zentralblatt f. allgem. Pathol. 1919.) Materiál fixujeme přímo v alkoholu. Řezy barví se po 5 minut v 1% ferrocyankalium s přidáním malého krystalku ferricyankalium a 1 kapky kyseliny solné. Řezy propírají se v destil. vodě a zabarví se kamencovým karminem. Přes alkohol a xylol uloží se do kanad. balsámu.

Barvení tuků.

Vedle uvedených reagensů a barvení na tuk (viz kyselinu osmičelou, tvrzení tekutinou Flemingovou atd.) obdržíme velice pěkných preparátů po zbarvení **S u d a n e m III.**

Preparáty mohou býti fixovány pouze ve směsích, které nerozpouštějí tuk, na př. v Müllerově tekutině, v tekutině Flemingově, v kys. chromové, ve formolu atd. Nejlépe, zhotovíme-li řezy po zmrznutí; řezy zbarvíme nejdříve haematoxylinem, diferencujeme ve slabě nakyseleném alkoholu, vymyjeme ve vodě a přeneseme na 5 minut do koncentrovaného roztoku **S u d a n u III.** v 90% alkoholu, potom promyjeme vodou a montujeme do glycerinu. Jádra buněk jsou zbarvena modře, tuk i ty nejmenší kapénky jsou červené.

O k a j i m a barví tuk výtažkem červeně z capsicum (španělský pepř). Celá vrstva z perikambia úplně zralých plodů capsicum se extrahuje v lihu 95% a pak se odpaří as o $\frac{1}{5}$ objemu. Řezy po zmrznutí z formolu nebo dvojchromanu dras. se barví as 5 minut, pak se vyperou nejdříve v 80% lihu, nato v destilované vodě a potom uloží do glycerinu.

Krevní sušené preparáty a jich barvení.

Velmi důležitou úlohu ve vyšetřování klinickém a pathologickém mají nálezy různých útvarů krvinek rudých, hlavně však útvarů lymfoidních, pokud se týče velikostí a různých granulací. Při granulacích přihlíží se ke granulacím t. zv. acido- a basophilním. Histologické vyšetření krve za čerstva (t. zv. nativní preparáty) jest velice nesnadné, ačkoli veškeré útvary a změny krvinek

rudých, jakož i různé útvary lymfoidních elementů, i pokud se týče různých granulací, jsou velice zřejmé, přece jest mnohem snazší a lze se i mnohem rychleji orientovati na preparátech sušených. Na kapku krve, která se píchnutím do naprosto čisté kůže prstu objeví, přiložíme čisté krycí skélko a na kapku na sklíčku položíme opatrně bez tlaku sklíčko druhé, které, jakmile se krev mezi oběma kapillaritou rozprostřela, stáhneme rychle stranou. Na obou skélkách zůstává přibližně stejnoměrně rozdělena krevní tekutina, kterou necháme na vzduchu uschnouti, což se stává po krátké době. Preparáty takto získané možno na dlouhou dobu, když jsme jich dobře označili, uschovati a je potom bez dalšího fixování barviti. Dle některých údajů barvení jest nutno preparáty krevní fixovati, a to buď horkem (120° C), nebo methylovým alkoholem nebo i ethylalkoholem absolutním, acetone, alkohol-etherem atd. Fixace dle *Weigenreicha*: do skleněné nádoby nalije se as 5 cc 1% kys. osmičelé a přidá se 10 kapek kys. octové. Čistá skélka krycí vloží se do par osmiových až na 5 minut; na takto připravená skélka natře se obvyklým způsobem krev, načež se dají opět do par osmium-octových. Po 1 minutě jest fixace provedena. Potom osuší se skélka nad plamenem, a vychladlá vloží se do slabě fialového roztoku hypermanganu, operou se ve vodě a usuší. V literatuře je nesčetné množství method barvení krevních preparátů, avšak udáváme jenom ty, které se nejlépe osvědčily. Nutno však varovati, abychom nečinili z nálezu, kde se buď elementy nezbarví nebo nastane jiné zbarvení, než metoda ta neb ona udává, nějakých zvláštních konklusí, neboť ani jedna ze všech method není naprosto spolehlivá a jistá, a sebe menší úchylnka, kterou nemožno vůbec postřehnouti, jest schopna podati naprosto úchylných obrazů.

Barvení krevních preparátů jest buď jednoduché, totiž barvíme pouze jedinou barvou nebo po jedné (modré) barvě následuje zbarvení jiné (červené), nebo barvíme směsí již předem připravenou.

Pro první orientaci o množství lymfoidních a podobných elementů v krvi slouží nejlépe zbarvení haematoxylinem; jádra buněk a mnohdy plasma určitých buněk jsou zřetelně zbarvena, krvenky rudé bezbarvé.

Jedno z nejlepších barviv jest methylová modř, a to její 1% vodný roztok, nebo barví se krátce Löffle-

rovo u modří methylovou (100 cm 1% roztoku žíravého louhu přidáním 30 cm koncentrovaného alkohol. roztoku methyl. modří). *H a e m a t o x y l i n - e o s i n*. Barvíme Ehrlichovým kyselým haematoxylinem (as 5—10 minut), když byly sušené krevní preparáty as po tři minuty fixovány methylovým alkoholem, kde předcházelo zabarvení eosinem ($\frac{1}{2}\%$ eosinový roztok v 70% alkoholu). Barvený preparát vymyjeme, osušíme filtračním papírem a uložíme do kanadské pryskyřice.

Barvení methylovou modří a eosinem. Barvení toto dalo původ velice různým methodám; užívá se eosinu jako barvy kyselé, methylové modří jako basické. Preparáty fixují se buď v teple 120°C nebo v methylovém alkoholu a barví se asi 5 minut v 0.5% eosinovým roztoku v 70% lihu, načež se omyjí, osuší nad plamenem a barví se vodním 1% roztokem methylové modří. Barví-li se příliš dlouho methylovou modří, tu ztrácí se zbarvení eosinové.

Barvení dle v. Müllera. Nutno připravit si roztok eosinový a to $\frac{1}{2}\%$ roztok alkoholický (70%), dále vodový $\frac{1}{4}\%$ roztok methylové modří nebo *E h r l i c h o v y* modří. Preparáty nutno fixovati v methylovém alkoholu nebo ve směsi stejných dílů acetonu a methylalkoholu. Aniž se preparát z tekutiny omyje, vloží se do $\frac{1}{2}\%$ roztoku eosinu alkoholického a barví se 3 minuty a po omytí vloží se do čerstvě připraveného roztoku: 20 kapek $\frac{1}{4}\%$ vodového roztoku methylové modří, 10 kapek $\frac{1}{2}\%$ roztoku eosinu v 70% lihu, kde se barví as $\frac{1}{2}$ minuty. Po omytí nutno rychle nad ohněm usušiti, nesmí se však preparát „připáliti“. Po správném barvení jsou jádra buněk modrá, eosinofilní granulace červené, neutrofilní tmavočervené, basofilní granula nezbarvena.

J e n n e r o v a methoda. Příprava tohoto barviva jest dosti obtížná, proto jest nejlépe použití již hotového roztoku. Na vzduchu fixované preparáty barví se as 2—3 minuty, operou se ve vodě a nechají na vzduchu oschnouti. Vedle krvenek barví se velice distinktně i granula, hlavně basofilní, která za jiných method se nebarví. Podobná je methoda *M a y - G r ü n w a l d o v a*. Možno barviti preparáty na vzduchu fixované 2 minuty až 24 hodin. Po obarvení se operou v dest. vodě a suší na vzduchu. Erythrocyty jsou jasně červené, jádra tmavomodrá, acidofilní granula temně červená, basofilní temně modrá.

G i e m s a, azurové barvení. Preparáty fixují se v ethylalkoholu $\frac{1}{4}$ až $\frac{1}{2}$ hodiny nebo v methylovém alkoholu 5—10 minut. Základní barvivo se rozředí, a to do 1 cc vody 1 kapka barviva; preparáty se ponechají v barvě as $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ hodiny; ohřátí barvy na 30—40° C urychlí barvení. Preparáty omyjeme dest. vodou, osušíme a uložíme do kanadské pryskyřice. Barvení toto předčí většinu různých údajů, jako **R o m a n o v s k é h o** barvení, které jest velice obtížné, poněvadž nutno barviti dvěma roztoky v naprosto určitém poměru; jinak povstávají sraženiny,

C i e c h a n o v s k i. Barvení kapilár žlučovýchodů **W e i g e r t o v o u** methodou na myelin.

Malé kousky jater fixují se ve 2—4% formolu, as po dva dny, načež se odvodní alkoholem a zalijí do celloidinu. Řezy velice tenké (5—10 μ) vloží se do mořidla, a to: 0.5% kys. chromové as na 2 hodiny. Po vymytí vloží se řezy do octanu měďnatého (nasycený roztok, který možno až na $\frac{1}{2}$ rozřediti) na 5—12 minut. Promyté řezy vloží se do **W e i g e r t o v a** haematoxylinu, kde po obarvení (po vytvoření laku chromoměďnatého) odbarvuje se **W e i g e r t o v o u** tekutinou (borax — červená krevní sůl). Preparáty do šeda zbarvené jest nutno z tekutiny vyjmouti, důkladně vymýti a montovati přes xylol do balsámu. (Metoda dosti nejistá, po dobrém obarvení dává však velice názorné obrazy.)

Barvení řezů orgánů lymfoidních a krvetvorných.

Uzliny lymfatické, slezina a dřev kostní fixují se v různých fixačních prostředcích (**M ü l l e r**-formol, **M ü l l e r**-osmium, **Z e n k e r o v a** tekutina, pikrová kyselina atd.), zalijí do paraffinu a hotoví se velice jemné (5 μ) řezy. Vedle obyčejných barviv možno použití na barvení granul v buňkách různých method. **E h r l i c h ů v t r i a c i d**: po fixaci v sublimátu barví se po 5 minut, po rychlém oprání řezů differenceuje se v slabém roztoku kyseliny octové (1 : 3000), načež se preparát odvodní, vyjasní v xylolu a uzavře do balsámu.

S t e r n b e r g barví jemné paraffinové řezy po fixaci v alkoholu v roztoku **G i e m s a** (0.4—0.5 cc základního barviva na 20 cc vody) po 24 hodin. Preparát opláchně se ve vodě a differenceuje v $\frac{1}{2}$ % kys. octové, kdež od-

cházejí modravé vločky a řez červená. Řez osuší se filtračním papírem, nechá se jen po krátkou dobu v alkoholu, kde poněkud zmodrá a uloží se přes xylol do balsámu.

S c h r i d e barví po fixaci Müller-formolu v roztoku Giemsa (2 kapky na 1 cc vody) po 20 minut. Opláchneme řez ve vodě, osuší filtračním papírem a vloží jej do absolutního čistého acetonu na 1 minutu; v acetonu nesmí se barva extrahovati. Z acetonu přenese řezy do xylolu a do balsámu.

Granula v buňkách.

Oxyfilní granula barví: Locle (Centrbl. f. Path. 1911) takto:

| | |
|-----------------------|-------|
| α -naphtholi | 1 g |
| Glycerini | 2 ccm |
| Kal. hydrooxydat. 25% | 1 ccm |

se rozpustí a přidá 10 ccm vody. Na řezech z čerstvého materiálu po zmrazení barví se granula leukocytů černě. Možno k roztoku přidati eosin neb methyl. modř. Barvíme-li 24 hodin, barví se i ostatní granula. Pro preparáty ze sleziny jest lépe přidati gentianovou violet.

M a r t i n o t t i. Řezy z paraffinu, nalepené na podložním skélku a zbavené paraffinu, polejí se jen tolik, aby se přikryly: M a y - G r ü n w a l d o v ý m roztokem barví se asi 1 minutu. Aniž se barvivo odstraní, nalije se na preparát destil. voda, ale tak opatrně, aby nepřetekla přes skélko. Barvíme dále as po 2 minuty. Pak odstraníme barvivo, aniž preparát opláchneme a nakapeme na řezy roztok „G i e m s a“ (1 kapku barviva na 1 ccm vody). Řezy omyjeme, osušíme filtračním papírem, rychle je proneseme absol. alkoholem a přes xylol montujeme do kanadské pryskyřice. Tohoto barvení možno použítí po různých fixacích, hlavně však po směsích se sublimátem.

Na preparátě jsou zbarvena jádra modře, eosinofilní buňky šarlachově červeně, neutrofilní a žírné buňky fialově.

P a n c h r o m p i k r i n o v á m e t h o d a pro orgány haemopoetické dle P a p p e n h e i m a.

Orgány fixují se v tekutině O r t h o v ě neb Zenker-H e l l y h o, nebo ve směsi některé z nich s kyselinou osmičelou. Paraffinové řezy barví se nejdříve asi po 5 mi-

nut ve zředěném roztoku *May-Grünwaldově* 1 : 3 a přenesou se bez omytí do zředěné směsi panchromatické:

| | | |
|-------------------|------|-----|
| Methylová modř | 1 | g |
| Tolluidinová modř | 0.5 | g |
| Azur I. | 1 | g |
| Methylová violeť | 0.5 | g |
| Eosin | 0.75 | g |
| Methylalkohol | 250 | ccm |
| Glycerin | 300 | „ |
| Aceton | 50 | „ |

Z tohoto roztoku připravíme barvivo tak, že k 20 ccm vody přidáme 10 kapek roztoku; barvíme 20 minut, řezy důkladně opereme a vložíme do vodného roztoku kyseliny pikrové 1% nebo do roztoku pikranu ammonatého 0.1% na tak dlouho, až úplně zčernají. Pak se opět dobře operou. Zvláštní pozor musíme dáti při odbarvování ve směsi alkohol abs. 1, aceton 1, xylol 12—16 dílů. Řezy osušíme filtr. papírem, načež je dáme do směsi alkohol-aceton-xylol, pak je vyjmeme, opět osušíme a dáme je znovu do směsi, konečně do čistého xylolu a do kanadského balsámu.

Fischer barví řezy dvojité, a to nejdříve kamen-covým karmínem, který se differencuje v nakysleném alkoholu (4 cc kys. solné na 100 cc 70% alkoholu), opere ve vodě a barví dále po 1—24 hodin v roztoku: 30 cc vody, 7 kapek kysel. octové 1 : 1000, 60 kapek roztoku *May-Grünwaldova*. Differencuje v kys. octové (na 150 cc vody 1—2 kapky kys. octové), až vystoupí jasně granula v buňkách; po rychlém odbarvení v abs. lihu ukládá řezy do xylolu a balsámu.

Zieler barví řezy po fixaci v Orthově nebo Zenkerově tekutině 5 minut v 0.25% *May-Grünwaldově* roztoku, po opláchnutí v dest. vodě převede je přes aceton do kanadské pryskyřice.

Butterfield barví řezy z materiálu fixovaného v 10% formolu v řídkém roztoku *May-Grünwaldově* po 5—10 minut a odbarví v absolutním lihu.

Assmann fixuje materiál v Zenkerově tekutině; řezy barví po několik hodin v roztoku *May-Grünwaldově*, differencuje 15 minut v 20 ccm vody s přidáním 5 kapek 0.1% kyseliny octové. Odvodní v absolutním lihu.

P a p p e n h e i m fixuje v Zenkerově tekutině s přidáním 10% formolu; barví 30 minut v roztoku May-Grünwaldově při 37° C. Odbarvuje v slabé kys. octové, potom aceton. alkohol.

H e l l y fixuje materiál v Zenkerově tekutině po 24 hodin s přidáním 5 % formolu. Vypírá po 2—24 hodin v tekoucí a opláchne v destil. vodě. Řezy barví v roztoku May-Grünwaldově na polovic vodou zředěném po 2—24 hodin, načež differenceuje ve 100% lihu.

E l l e r m a n n fixuje materiál (tenké, as 2 mm tlusté plátky) v tekutině Helly-Maximově (viz tuto str. 61). Řezy as 5 μ silné předbarví formol-eosinem (1% eosin ve vodě 5 ccm, formolu 0.25 ccm) 15 minut, načež barví řezy v roztoku May-Grünwaldově na polovinu vodou zředěném po 30 minut; přenesení do destilované vody na 5—10 minut, načež differenceuje v 100% alkoholu po 2—4 minuty a přes xylol ukládá do kanadského balsámu.

Slabší alkohol než 100% nedává dobrých výsledků. Na dobře zbarvených řezech jsou jádra intenzivně zbarvena, reticulum a vazivo slabě modré, neutrofilní granula jsou špinavě červená, eosinofilní sytě červená; basofilní granula temněmodrá. Erythrocyty a erythroblasty mají protoplazma hnědě červené.

Oxydasy a peroxydasy.

Loele. (M. med. Woch. 1910 Folia haematolog. 1912.) Oxydasy-

| | | |
|--------------|----------------|-------|
| I. Naphthol- | Naphthol | 1 g |
| | Louh dras. 25% | 1 ccm |
| | aq. dest. ad. | 200 |

Barviti řezy zmrzlé, fixované ve formolu.

| | | |
|---------------|---------------------|-------|
| II. Naphthol- | Naphthol | 0.5 g |
| | Louh draselnatý 25% | 10 |
| | Glycerin | 20 |
| | Vody | 100 |

Barví se řezy, po fixování ve formolu, zmrzlé; barví se jen granula.

Naphthol-Gentianová violet. Použije se barviva jako II. naphtholu, k tomu se přidá 10 cc vodného roztoku Gentianové violeti. Filtrovati dlužno přímo na hodinové sklíčko, kam se řezy uloží. Řezy fixované ve formolu po

zmrznutí nutno barviti po 24 hodin. Dobarvení se provádí vodným roztokem eosinu.

P e r o x y d á s y - U n n a.

Řezy nutno zhotoviti z čerstvého nefixovaného materiálu.

| | |
|-----------------|---------|
| Methyolová modř | 0·2 |
| Rongalit | 0·4 |
| 25% kys. solná | 4 kapky |
| Vody dest. | 10 cc. |

Směs tato se za tepla rozpustí, do sfiltrované barvy ukládají se řezy z dest. vody skleněnou jehlou, kde se ponechají as 2 až 5 minut. Nato vyjmou se skleněnou jehlou, opláchnou v dest. vodě a ukládají se na podložní sklíčko do arabské klovatiny. Trvalé preparáty možno zhotoviti tím způsobem, že obarvené a opláchnuté řezy vloží se do 10% molybdeňanu ammonat. a přes alkohol xylol uloží se do pryskyřice.

Některé důležitější reakce botanické.

B u n i č i n a.

Buničina zmodrá roztokem jodu v chloridu zinečnatém. V kyselině solné rozpustí se čistý zinek v nadbytku, tento roztok odpaříme na vodní lázni na hustou tekutinu. K 20—30 g přidá se 5—6 g jodidu draselnatého a 1 g jodu. Na reakci použije se jedné kapky.

D ř e v o v i n a.

Dřevovina pozná se po reakci roztokem síranu anilínu, jímž zežloutne.

Roztok phloroglucínu v kyselině solné zabarvuje zdřevnatělé části červeně (7 cm kyseliny solné, 8 cm alkoholu, 0·1 g phloroglucínu).

Dřevovinu možno prokázati na řezech též zbarvením.

Dle Zimmermana barví se tenké řezy as $\frac{1}{4}$ hodiny vodným roztokem fuchsinu, přenesou se na krátko do kys. pikrové (zásobní nasycený roztok kys. pikrové v alkoholu 1 díl na 2 díly vody). Řezy ztemní, nato se v alkoholu odbarvují a přenesou se přes xylol do kanadského balsámu. Podobného zbarvení možno dosíci i jinými barvivy (safranin, kys. fuchsin gentiana viol, dle Gramma atd.).

K o r e k.

Jest celá řada chemických reakcí na průkaz zkorovatělých stěn buněčných. Jod s kys. sírovou, nebo roztok jodu v chloridu zinečnatém zbarví korek žlutě až hnědě. Nechá-li se na řezy působiti Eau de Javelle po 1—2 hodiny, zbarví se použitím chloridu zinečnatého zdřevnatělé stěny buněk fialově, zkorkovatělé pak žlutě.

Máme-li korek zjistiti barvením, tu nutno použití týchž barviv, jako pro tuky: Šarlachová červeň, Sudan, Alkanin a j. Sudan nutno rozpustiti ve stejných dílech alkoholu-glycerinu. Řezy polité barvou zahřejí se do varu (alkoholu). Korek zbarví se červeně.

Dvojitě zbarvení na dřevovinu a korek možno různě provésti, na př. barviti fuchsinem, nato kys. pikrovou a dobarviti kamencovým haematoxylinem. Dřevovina jest červeně, korek modře zbarven; podobně barví safranin-anilínová modř a jiné kombinace.

B í l k o v i n y.

Bílkoviny se prokazují v řezech barvením dehtovými barvivy jako: fuchsin, methylová modř a j.

T ř í s l o v i n a.

Tríslovina se pozná roztokem zelené skalice (vytvoří se černozelelé neb černomodré sraženiny tanátu železnatého).

P r y s k y ř i c e.

Naprosto jisté metody na mikroskopické prokázání pryskyřice nemáme. Působí-li vodný roztok octanu měďnatého po delší dobu, nejméně 1 týdne (lépe jest nechati působiti ještě déle na pryskyřici), zbarví se tato smaragdově zeleně. Barvu tuto i po vymytí v tekoucí vodě podrží. Řezy možno v slabém alkoholu konservovati a potom uložit do glycerin-gelatinu.

Této metody se dá použití při vyšetřování mykologickém.

R e a k c e n a š k r o b a b a r v e n í š k r o b u.

Nejdůležitější reagens na škrob jest jod. Mayer používá k důkazu škrobu roztoku jod-jodkalie: 0.5 g jodkalie rozetře v malém množství destilované vody s 2 g jodu a po rozpuštění doplní se dest. vodou na 100 ccm. Preperáty po jodové reakci nejsou stálé.

Průkaz škrobu v chloroplastech a jinde možno dle Mayera provésti chloral-jodem; 5 g chloralhydrátu ve

2 g vody nasytí se jodkaliem. Při provádění reakce přidá se k roztoku několik krystalů čistého jodu. Chloralhydrat prosvítí dostatečně preparát, zrnečka škrobu zbarví se modře.

Barvení škrobu.

Suchá zrnka škrobová možno zbarviti tím způsobem, že smícháme škrob s barvou, necháme opět uschnouti, nato přelejeme pikrovou kyselinou neb velice slabým roztokem kalcium-nitrátu.

Fixování preparátů, ve kterých hodláme prokázati škrob, děje se nejlépe v roztocích a směsích chromových solí. Skoro veškerá zásadická dehtová barviva barví rychle škrobová zrnečka. Zvláště silně barví gentianová a methylová violet.

Němce. (Ber. d. botan. Gessel. 1906). Fixování preparátů děje se kys. chromovou neb Flemingovou tekutinou, neb dle udání Němce: Nasycený vodný roztok kys. chromové 100 dílů, vody 200 dílů, kys. octové led. $\frac{1}{2}$ dílu, kys. sírové $\frac{1}{2}$ dílu (pro jemné organismy jen $\frac{1}{10}$ dílu). Řezy přenesou se z vody na 10—60 minut do 2% vodného roztoku taninu, operou se ve vodě as po 1 minutu, pak se přenesou na 5—15 minut do mořidla $\frac{1}{2}$ % dávivého kaménku. Konečně se as po 3 minutách vymývají v několikrátě vyměněné vodě a vloží se do barvy, nejlépe gentianové violeti, na 30 min., načež se vyperou a odbarvují v alkoholu tak dlouho, dokud vycházejí barevné vločky, načež se přenesou přes xylol do kanadské pryskyřice. Škrob zbarven tmavě fialově; možno předbarviti parakarmínem neb železitým haematoxylinem.

XI. Injekční metoda mikroskopická.

Při vyšetřování průběhů a vztahů cév v různých orgánech jest nutno cévy až do nejjemnějších kapillár naplniti nějakou barevnou massou, která by toto studium umožnila. Naplňování i těch nejjemnějších cév touto methodou nazýváme *injekcí mikroskopickou* na rozdíl od injekce makroskopické, kde jde pouze o naplnění jen hrubších větví cévních, které možno makroskopicky preparovati. Mikroskopická injekce provádí se většinou barevnou massou, která jest průhledná. Nejobvyklejší jest barva modrá pro venosní a barva červená (karmín) pro arteriální systém. V některých případech však použijeme barev t. zv. opakních, neprůhledných. Takto injikované cévy studujeme při dopadajícím světle. Těchto barevných mass užijeme jen ve zvláštních případech, hlavně v korrosivních injekcích.

Příprava barev pro mikroskopickou injekci.

Barva červená — karmín. K mikroskopickým injekcím používáme barev, které zůstávají průhlednými; jsou to po většině barvy přimíchané k tekuté gelatině. Příprava červené karmínové massy injekční jest velice obtížná. Dlužno uvést, že massa injekční musí býti tak připravena, aby barva nebyla z cév extrahována, jinak zbarví nám celé okolí, a injekce jest nezřetelná. V tom případě říkáme, že barva diffunduje. V druhé řadě nesmí býti barvivo, které přidáme do gelatiny, sraženo. Pak jest injekce naprosto nevzhledná, výplně cév jsou neprůhledné a zrnité.

Již z toho, že nalezneme v různých knihách velkou řadu různých předpisů k hotovení červené barvy injekční, možno souditi na obtížnou přípravu její. Příprava jest tato :

Určité množství čistého suchého karmínu, t. zv. naccaratu, rozetřeme na misce na prášek, pipetou na-

kapáme do něho čistého ammoniaků a mícháme skleněnou tyčinkou. Ammoniaků dáme tolik, kolik jest nutno, aby se všechen karmín rozpustil. K této husté barvě přidáme tolik destilované vody, kolik nutno, aby barva zůstala hodně sytá. Barva tohoto karmínu ammoniakálního jest sytě fialová.

Na velkou porcelánovou misku připravíme si čistou gelatinu, na kterou nalejeme destilovanou vodu, ve které necháme gelatinu as $\frac{1}{2}$ až 1 hodinu ležeti, aby se náležitě promyla. Za tu dobu gelatina nabobtná, po slití přebytečné vody gelatinu ohříváme tak dlouho, až se úplně rozpustí. Do teplé tekuté gelatiny vlejeme za neustálého míchání skleněnou tyčinkou připravený roztok karmínu. Karmínem zbarví se gelatina do tmavočerveně-fialova. Trochu karmínu uschováme do skleněné eprouvety za příčinou další kontroly. Je-li gelatina dobře s barvou promísena, tu přistoupíme k neutralisaci barvy; v tom spočívá hlavní vtip správné přípravy. Kdybychom touto gelatinou, ze které jest dosud cítiti ammoniak, materiál injikovali, tu karmín diffunduje úplně z cév a celé okolí se zbarví.

Připravíme si 3—5% kyselinu octovou, kterou nutno ammoniak neutralisovati; neutralisaci provádíme velice pomalu a opatrně. Gelatinu uschováváme ustavičně ve stavu tekutém, a do ní pipetou nakapáváme za neustálého míchání připravenou kyselinu octovou. Jakmile ukápneme kyselinu do barvy, tu vidíme, že na místě kapky změnil se ihned tmavá fialová barva do barvy cihlově světle červené. Vkapujeme, jak již uvedeno, pomalu kyselinu do barvy, při čemž po kratší neb delší době pozorujeme, jak mění se barva karmínu a jak stává se světle červenou. S počátku možno sice poněkud rychleji vkapovati, avšak později již jen velice opatrně. Čas od času srovnáváme různost a přeměnu barvy po kyselině s onou základní barvou, kterou jsme si ponechali v eprouvettě. Nesmíme zapomenouti, a s tím dlužno rovněž při neutralisaci počítati, že neustálým ohříváním uniká též část ammoniaků. Když pozorujeme, že se barva změnila na jasně červenou s nádechem do fialova, přestaneme vkapovati. Barva gelatiny nesmí se změnit na barvu světle červenou, cihlovou, totiž na takovou, jakou pozorujeme po každém vkapnutí kyseliny do gelatiny.

Změní-li se barva až do světločervena, pak jest sražen karmín, který se nám v mikroskopu jeví jako jemná nebo hrubší zrůčka. Barvy takové nemožno k injekci upotřebiti. V tom případě nutno karmín opět ammoniakem rozpustiti a pochod neutralisace znovu započítí. Je záhodno, aby se sytost barvy, po případě první počátky sražení kontrolovaly mikroskopem. Za tím účelem přejedeme namočenou skleněnou tyčinkou v barvě po podložním skélku a prohlížíme nátěr při slabém zvětšení. Barva musí býti červená, stejnoměrně průsvitná, a i ta nejmenší částéčka musí býti dosti tmavá.

Příprava této karmínové massy je dosti obtížná. Jest možno obdržeti již hotovou barvu v obchodě s mikroskopickými potřebami.

Následkem této velice obtížné práce, připraviti vhodně červenou massu k injekci, hledána byla odpomoc. Bylo udáno velice mnoho předpisů, z nichž nejlépe se osvědčuje příprava gelatinové massy dle udání B. Krause (*Zeitschr. f. wiss. Mikroskop.* XXVI. 1909.).

Gelatinové plotny močí se ve vodě tak dlouho, až důkladně zbobtnají, načež nutno vodu řádně odkapati. K ulehčení práce používá se plechové nádoby rozměrů $28 \times 15 \times 10$ cm, do které se vsunuje jiná nádobka sítěná s držadlem. Do nádoby této možno vložit asi 100 g suché gelatiny.

Asi 50 plotének suché gelatiny vloží se do síta, které se ponoří s gelatinou do nádoby, naplněné dest. vodou. Asi po dvou hodinách, kdy gelatina úplně zbobtnala, vyjme se síto a voda se nechá as $\frac{1}{2}$ hodiny odkapovati.

K barvení gelatiny slouží tento roztok: 100 g boraxu rozpustí se v horké vodě dest. a do něho přidáme za varu 15 g jemného karmínu. Svařená barva nechá se přes noc ustáti, pak se bez filtrování sleje. Barva vleje se do nádoby a do ní vloží se síto s gelatinou a ponechá se tu 48 až 72 hodiny. Gelatinu vyjmeme, barvu necháme odkapati, načež zbarvenou gelatinu vymýváme v tekoucí vodě tak dlouho, až přestane zbarvená voda odtékat. Připravíme slabou kyselinu solnou (2%) v obyčejné vodě. Do velké, ne příliš vysoké kamenitohliněné nádoby nalijeme kyselinu a uložíme do ní na nejvýše 5—6 plotének gelatiny, kterou za stálého obracení promýváme. Barva původně karmoasinová přechází do třešňové červené. Gelatinu promýváme tak dlouho, až se kyselá voda již

nezbarvuje. Jakmile se barva změnila, nutno ploténky vyjmouti (jinak by se barva stala příliš světlou) a vložit je do vody, ve které se $\frac{1}{2}$ až 1 hodinu důkladně promývají za účelem odstranění veškeré kyseliny. Potom ploténky vyjmeme a necháme po 3—4 hodiny státi, aby veškerá voda odkapala. Ploténky možno v chladu nechat vyschnouti, avšak je lépe, dokud jsou nabobtnalé, ve vodní lázni je rozpustiti. Do teplé barvy přidáme kousek kafru k zamezení vzrůstu plísní.

Takto připravená barva jest velice dobrá, jest transparentní, konsistentní a hlavně nedifunduje při injekci.

Vodný roztok berlínské modři bez gelatiny.

Nejjednodušší nastříknutí cevstva obdržíme tím způsobem, že injekci provádíme koncentrovanou suspensí berlínské modři ve vodě s přidáním něco málo glycerinu. Berlínská modř sráží se v cévách, přilne úplně ke stěnám, takže po utvrzení možno docíliti dosti pěkných preparátů, kde jsou cesty, hlavně kapilláry, dobře vyznačeny. Jednu vadu ovšem takové preparáty vykazují, totiž tu, že větší cesty nejsou naplněny, jen něco barvy zůstává na stěně vězeti. Vodné modři berlínské používá se k injekcím v takovém případě, kde jde o velice jemná síťiva kapilární, do kterých by se gelatinová massa jen ztěžila dala vpraviti. Tím způsobem nastříkujeme na př. kapilláry žlučové v játrech, vývody slinných žláz, mikteru, kanálky ledvinné, varlat a podobné útvary. Nastříkávání těchto kapillár a kanálků provádí se pod konstantním tlakem (viz níže).

Příprava berlínské modři rozpustné.

Berlínskou modř velice dobře připravenou obdržíme již hotovou v odborných závodech; přesto však udáváme přípravu této modři na tomto místě:

| | |
|----------------------|-------|
| Ferrocyankalium | 110 g |
| Ferri sulfur. cryst. | 70 g. |

Nejdříve rozpustíme ferrocyankalium ve vodě, ohřejeme až na bod varu a přidáváme pozvolna, za neustálého míchání, síran železitý. Modrou směs nutno po delší dobu as dvou hodin vařiti. Po vychladnutí směs filtrujeme a filtrát nutno destilovanou vodou tak dlouho promývat,

až protéká čistá modrá barva. S počátku odtéká voda žlutá, sulfátem železa zbarvená.

Jiný předpis pro přípravu berlínské modři ve vodě rozpustné je tento:

217 g žluté krevní soli rozpustíme ve dvoj- až trojnásobném množství horké vody, a když se všechna sůl rozpustila, přilejeme ještě jednou totéž množství vody, takže celkem činí směs as 1 litr. Dále připravíme si roztok 100 g chloridu železitého v takovém množství vody, aby činil opět as 1 litr. Nato ke každému z těchto roztoků přidáme po 2 litrech roztoku Glauberovy soli, důkladně promísíme, a chováme každý roztok zvlášť. Potom smísíme libovolný díl roztoku I. (krevní sůl se solí Glauberovou) se stejným množstvím roztoku II. (chlor. železitého s Glauberovou solí). Tím povstala modrá sraženina, již pak na filtru tak dlouho vypíráme, až odtékající voda začíná se silně na modro barviti. Poté ustaneme ve vypírání a usušíme modrou sraženinu v mírné teplotě.

Takto připravená, ve vodě rozpustná berlínská modř, když byla dokonale ushla, jeví na lomu krásný bronzový lesk.

Barva pro modrou injekci gelatinovou.

K hotovení modré barvy injekční používáme suché berlínské modři v prášku, který musí se lehce ve vodě rozpouštěti. (Není to roztok, nýbrž velice jemná suspence.)

Rozpustíme ve vodě určité množství suché berlínské modři a to tolik, aby barva byla tmavě modrá. Na porcelánové misce připravíme si gelatinu stejným způsobem, jako při barvě červené. Modrý roztok ohřejeme a teplou barvu necháme po malých kapkách za neustálého míchání skleněnou tyčinkou do gelatiny vkapovati. Přikapávání musí se díti velice pomalu, jinak srazí se modř ve velké neb menší chuchvalce, které se již nerozpustí. Přikapávání děje se tak dlouho, až při kontrole mikroskopem vidíme, že i velice tenká vlákna jsou sytě modře zbarvena.

Jinou přípravu modré injekční massy hotovíme tím způsobem, že použijeme teplého, velice řídkého roztoku berlínské modři a řídkého roztoku gelatiny, které navzájem promísíme skleněnou tyčinkou. Pak přidáme trochu barvy tmavší, nato opět trochu gelatiny, a jednak

pozvolným přidáváním koncentrovanější barvy, jednak koncentrovanější gelatiny hledíme docílit gelatiny sytě zbarvené, kterou vypařováním vody necháme zhoustnouti. Gelatinovou massu, chováme-li ji ve stavu vlhkém, nutno chrániti před plísněmi přidáním chloralhydrátu nebo podobných antiseptických prostředků. Massu gelatinovou studenou možno též ve stavu vlhkém na plátky rozřezati a tyto nechati úplně vyschnouti. Před upotřebením nutno suchou massu rozpustiti v teplé vodě.

Vedle barvy červené a modré používá se s úspěchem ještě gelatiny se stříbrem, která se kys. pyrogallovou zredukuje. Kapilární cesty jsou pod mikroskopem žlutě vyplněny, větší cesty mají barvu hnědou.

Stříbrná gelatina Hoyer a.

Do 100 g koncentrovaného roztoku gelatiny dáme 100 cc 4% roztoku dusičnanu stříbrnatého. Po důkladném promíšení za tepla přidáme jen velice málo kys. pyrogallové, která stříbro ihned zredukuje. Nato přidáme ještě asi $\frac{1}{10}$ objemu gelatiny glycerinu a chloralhydrátu (aby odpovídal as 2% celé massy).

Injekce stříbrem v gelatině k zbarvení endothelových buněk (jejich hranic) v cévách.

Ke 100 g rozehřáté gelatiny přidá se 25 cc arg. nitr. Po injekci uloží se materiál do alkoholu. Na světle redukuje stříbro, kterým jsou hranice endothelií tmavohnědě impregnovány.

Barev zde uvedených se nejčastěji s prospěchem používá. Při zhotovení massy karmínové jest ovšem nejdůležitější vystihnouti správně neutralisaci, aby karmín nebyl sražen; to jest ovšem manipulace, které možno jen cvikem se naučiti. Veškeré různé předpisy jsou v principu stejné (dle Ranviera, Hoyer a, Fola a j. v.) a vždy záleží hlavně na neutralisaci. Berlínskou modř ve vodě rozpustnou možno si připravit z ferro-cyankalia a síranu železnatého. Leč v dnešní době netřeba teprve barvu obtížně připravovati, neboť jest možno v obchodech dostati velice čistý, ve vodě snadno rozpustný preparát berlínské modři. (Běžný název „rozpustná berlínská modř ve vodě“ jest vlastně nesprávný, poněvadž se barva nerozpouští, nýbrž tvoří jen velice jemnou suspensi.)

Přístroje k injekcím.

V první řadě používá se k injekcím kovových nebo skleněných stříkaček různého objemu, dle velikosti orgánu nebo celého zvířete, které chceme injikovati. Stříkačka musí býti tak zhotovena, aby píst v každé výši přiléhá k stěnám stříkačky úplně neprodyšně, a musí se lehce posunovati. Na konci stříkačky jest šroubovitý násadec, na který se připevňují kanyly, které musí těsně přiléhati, aby barva injekční neunikala. Máme vždy pohotově několik druhů kanyl různých světlostí; lumen kanyly řídí se vždy dle lumina cevy, do které se má tato zavést. Někdy jest nutno použití kanyl velice jemných, v tom případě doporučují se kanyly skleněné, které si možno vždy zhotoviti, a to tím způsobem, že rourku skleněnou určitého průměru ohřejeme na kahanu (lihovém nebo Bunsenově hořáku) do červena a vytáhneme ji do žádané ploušťky. Na „vytaženém“ konci musí býti kanyla vždy poněkud širší, aby bylo možno na jejím tenším krčku cevou dobře podvázati, aby nesmekla se zpět. U kanyl kovových je taktéž konec širší, za ním pak následuje užší krček. Skleněné kanyly připevňují se k stříkačce gumovými rourkami; aby rourka gumová s kanyly se nesesmekla, nutno, aby kanyla na svém širším konci byla kolem rozšířena. Gumovou rourku nutno též pevně na násadec stříkačky přivázati.

Injekce stříkačkou prováděné jsou proto obtížné, že velice snadno při větším tlaku povstávají v cévách trhliny a barva injekční tvoří t. zv. extravasáty — výlevy do tkání. Jen dlouhým cvikem možno usouditi, pod jakým tlakem smíme pístem stříkačky injekční massu tlačiti, aniž bychom se obávali, že povstanou výrony barvy do tkáně, čímž ovšem injekce stává se nepotřebnou.

K odstranění této vady zhotoveny jsou různé přístroje injekční, které mají tu výhodu, že možno regulovati tlak, pod kterým se barva injekční do cev vhlání, anebo je již přístroj tak zařízen, že tlak zůstává ustavičně stejný. Již v r. 1860 zhotovil si *L u d w i g* přístroj injekční tím způsobem, že do zátky láhve se širokým hrdlem vložil dvě rourky (obr. 58.); jednu vedl ke dnu láhve, druhá končila hned pod zátkou. Tato rourka spojena byla rourkou gumovou s injekční kanylou. Rourka druhá, která končila na dně láhve, byla spojena s nálevkou, do které

nalila se rtuť. Láhev naplněna byla barvou injekční. Rtuť z nálevky vtékala na dno láhve a vytlačovala barvu druhou rourkou a kanylou. Tento přístroj měl tu vadu, že tlak nebyl stálý, nýbrž ubývááním rtuti v nálevce stával se stále menším, takže bylo nutno rtuť neustále do nálevky přilévati. Další vada spočívala v tom, že rtuť přicházela s barvou v přímý styk, takže se barva kazila.



Obr. 58.

Hering sestavil injekční aparát na tomtéž principu jako Ludwig, ale použil dvou lahví; do první vtékala rtuť, která zhušťovala vzduch v láhvi druhé. Tím vymýtil direktní styk rtuti s barvou. Než ani tento aparát úplně nevyhovoval. Proto zhotovil Hering přístroj jiný, na podobném principu. Na místo lahví použil dvou skleněných koulí, spojených skleněnou rourou mezi sebou. Koule upevnil v plechovém pouzdře, které se otáčelo kol vodo-

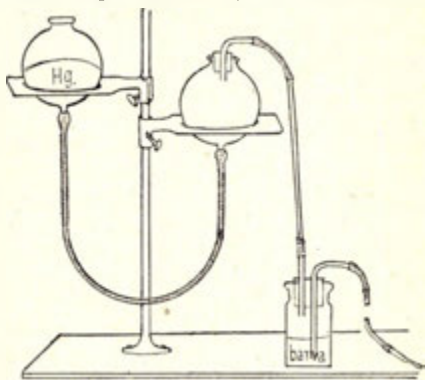
rovné osy. Při nahnutí přístroje přetékala rtuť z jedné koule do druhé prázdné, která byla spojena gumovou rourou s lahví, ve které byla injekční barva. Přítokem rtuti z jedné koule do druhé nastal tlak vzduchu, který se přenesl rourou do láhve s barvou a tím byla tato vtlačena do cev. K docílení většího neb menšího tlaku byl pořízen aparát tak, že bylo možno kouli se rtutí přivést do libovolné výše, čímž se tlak zvyšoval neb snižoval.

Aparát ten jest velice kombinovaný. Ravier popsal mnohem jednodušší přístroj na tomtéž principu zhotovený, který možno velice snadno sestaviti (obr. 59.).

Na stojanu připevníme dvě skleněné koule, které mají na protilehlých pólech násadce; obě koule se spojí gumovou rourou. Dále si připravíme láhev se širokým hrdlem, jejíž zátka má dvojí vrtání pro skleněné rourky. Jedna rourka, která končí v láhvi u dna, ohne se nad zátkou a spojí se gumovou rourkou s injekční kanylou; druhá rourka, která končí hned pod zátkou, spojí se s krčkem prázdné koule. Do láhve dáme injekční barvu a naplníme ji asi do $\frac{2}{3}$. Nyní nalejeme do první koule rtuť, která pozvolna přetéká do koule druhé, vzduch

v kouli stlačí a tlak ten přenáší se do láhve s barvou, ze které stlačený vzduch vhání barvu do cev. Tímto způsobem obdržíme dosti stálý tlak, který možno posunutím rtuťové koule dle potřeby zvýšiti neb snížiti.

Tento přístroj jest dosti praktický a možno jím injikovati současně dvě i tři různé barvy pod stejným tlakem. K tomu účelu je jen zapotřebí, aby ve vzduchové kouli byla zátka se dvěma neb třemi otvory, do kterých zasadíme rourky a tyto spojíme na př. jednu s lahví s barvou modrou, druhou s červenou, po případě třetí s jinou barvou. Hodláme-li injikovati barvu gelatinovou, jest samozřejmo, že láhev, ve které se barva nalézá, musí býti uložena v horké vodě, aby gelatina zůstala tekutou.



Obr. 59.

Byla zhotovena velká řada podobných přístrojů, avšak u žádného z nich nebylo dosaženo ideálního, konstantního tlaku a jen přibližně stálého a stejného u velmi komplikovaných přístrojů.

Nacvičíme-li se dobře, možno prováděti injekce nejlépe stříkačkami, jde-li o injekce barev průsvitných gelatinových. Chceme-li injikovati t. zv. konstantním tlakem barvy tekuté, vodové nebo olejové, po případě éterem zředěné, pořídíme si tento tlak velice jednoduše tím způsobem, že na nálevku připevníme delší, 1 až 1.5 m dlouhou gumovou rourku, kterou spojíme s kanýlou. Svorkou stlačíme rouru a do nálevky nalejeme injekční barvu. Podle výšky, ve které upevníme nálevku s barvou, řídíme přibližně tlak, pod kterým hodláme nastříkovati. S počátku snížíme nálevku, čímž injikujeme při menším tlaku; nestačí-li tento tlak, zvýšíme jej tím, že upevníme nálevku poněkud výše.

Příprava materiálu k injekci.

Z nejdůležitějších prací pro docílení správné a úplné injekce jest příprava materiálu. Nevhodně připravený materiál pokazí úplně výsledek. Jak si máme počínati, uvedeme na příkladě injekce systému arteriálního u menšího zvířete.

U zvířete narkotizovaného vypreparujeme art. carotis communis, hledíce k tomu, abychom co nejméně přerézali menší cesty, které možno *Paquelinem* nebo do červeně rozehřátým nožem přizehnouti. Pod vypreparovanou carotis zavedeme asi ve vzdálenosti 1 cm dvě ligatury. Dříve připravíme si vše, čeho k injekci jest zapotřebí, totiž: barvu, stříkačku s náležitými násadci (kanylymi), svorky na stisknutí otevřených cest atd. Jsme-li s přípravou hotovi, vezmeme jednu kanylu takové tloušťky, abychom ji pohodlně mohli zavést do cesty. Nejdříve důkladně zavážeme připravenou ligaturu na horní, proximální části carotis, delší konce ligatury necháme volně viseti, přehodíce je na horní stranu. Hned nato stiskneme cestu pod dolní připravenou ligaturou svorkou, a to za tím účelem, aby po proříznutí cesty nenastalo ihned krvácení. Je-li cesta smáčkuta, napneme ji mezi svorkou a hořejší ligaturou a prořízneme ji v její horní stěně as do jedné třetiny, nejdříve napříč malými nůžkami, a hned nato rozšíříme řez po délce. Do otvoru vložíme připravenou kanylu, na níž jest přivázána gumová rourka v délce 10—15 cm, a kanylu zavážeme připravenou ligaturou do cesty. Nyní, po otevření svorky, kterou jsme podchytili cestu na jejím dolním konci, necháme kanylou odtékat krev, aby cesty celého těla byly co možno bezkrevné, a vypouštíme krev tak dlouho, až zvíře úplně vykrvácelo. Horní konec cesty musí zůstat zavázán a to z těchto důvodů: kdyby cesta byla přeríznuta, aniž jsme ji podvázali, vnikne do cesty vzduch, který proudem krvinným dostane se až do nejmenších rozvětvení kapillár, a dle množství vzduchu vyplní se menší neb větší oblast cévní. Při následné injekci do cest narazí barva na vzduch, který vyplňuje válcovitě celé lumen cesty a jako naprosto nestlačitelná hmota nepropustí barvu do cest. Použije-li se většího tlaku, roztrhá vzduch cesty, massa vytvoří veliké výlevy, následkem čehož jest celá práce marná.

(Hodláme-li některé jednotlivé orgány, lidské neb zvířecí, po smrti injikovati, nutno k tomu přihlížeti, abychom, dříve než orgán vyjmeme, alespoň velké cevy podvázali a tak vniknutí vzduchu do orgánu zamezili; v nejčastějších případech jest do cev vniklý vzduch příčinou nezdařených injekcí, aniž je si injektor vědom této příčiny.)

Je-li materiál takto připraven a jsou-li cevy úplně krve prázdné, zavedeme kanylu, barvou již naplněnou, do horního konce cevy, který jsme dříve ligaturou podvázali. Počínáme si tak, že opět svorkou stiskneme cevu nad ligaturou, prostříhneme ji jen malým otvorem napříč, vložíme do otvoru jednu branche nůžek a rozstříhneme ji po délce; novou ligaturu podsuneme pod cevu za otvorem, do něho vložíme kanylu, kterou ligaturou pevně zavážeme. Nyní možno svorku s cevy odstraniti a počíti nastříkování. Používáme-li stříkačky, tu tlačíme velice opatrně na píst, aby nebyl tlak příliš vysoký, stejnoměrně po celou dobu injekce.

Hodláme-li nastříkovati celé zvíře z aorty, tu počínáme si právě tak, jak dříve uvedeno, jen musíme přihlížeti k tomu, abychom veškeré cevy, které jsme musili přerýznouti při otevření hrudníku (aa. intercostales, mammae atd.) ihned podchytiti, podvázali, po případě přizhehli. Po vsunutí ligatur pod aortu cevu stiskneme opět svorkou před kanylou a teprve po zavedení a podvázání kanyly před nastříkovaním svorku odstraníme. Jen tak možno docíliti úplné injekce.

Má-li se nastříkovati nějaký orgán po smrti, buď zvířecí neb lidský, gelatinovou barvou, tu nutno po podvázání cev celý orgán prohráti na temperaturu gelatinové massy as do 37—40° C. Kdybychom nastříkávali orgán silně prochlazený, tu chladem srazí se ihned gelatina a nevnikne vůbec do cev.

Do velkých cev zavádějí se kanyly dosti lehce, avšak velké trpělivosti a cviku vyžaduje zavádění kanyl do malých cev nebo žlázových vývodů. Tu stává se velice často, že po prostříhnutí otvoru do cevy nemožno kanylu zavésti; příčinou toho bývá buď tlustá kanyla, která má větší průměr než otvor cevy, nebo častěji to, že endotelová výstelka cevy při vložení kanyly se od stěny její odloupila a shrnula se před kanylou. V takovém případě pomáháme si tím způsobem, že ohlazeným tupým drát-

kem nebo sondou uvolníme cestu v cevě. Mnohem lépe pochodíme, uděláme-li, kde to možno, nový otvor do cevy poněkud dále od prvního.

Injekční metoda cestva pro vyšetřování röntgenovými paprsky.

Pro obrazy cev různých orgánů, které se mají ostře rýsovat na röntgenovém snímku, nutno použití takové hmoty, které nedovolí X paprskům proniknouti. K tomu účelu nejlépe se hodí barviva těžkých kovů, jako cinobr, minium a j. Pojivo pro tato barviva nutno voliti dle potřeby. Jest samozřejmé, že nesmí býti injekce tak prováděna, aby se naplnily veškeré kapilláry; obrazy po takové injekci jsou úplně zastřené a nevykazují žádných kontrastů. To děje se hlavně tehdy, nastříkneme-li orgán vodní emulsi protargolu.

Velice dobře se hodí Teichmanova massa s rumělkou, nebo sklenářský tmel jemně utřený, poněkud éterem rozředěný, do něhož přidáme minium nebo rumělku. Jednoduchou a velice dobrou massu injekční máme v tak zv. šedé masti (Unguentum cinereum). Obrazy po této injekci jsou velice jasné.

XII. Rekonstrukční metody.

Velice důležitý činitel při mikroskopickém badání, hlavně však v mikroskopické anatomii v užším slova smyslu jest metoda rekonstrukční. Takto nazýváme metodu, kterou možno zhotoviti nákres nebo plastický model určitého orgánu, systému v celku nebo v detailnějším rozboru. Této metody používáme velice často, ba možno říci, že nemožno se bez ní obejít při studiích embryologických. Ve mnohých případech postačí pouhá rekonstrukce kresbou, v jiných nutno sáhnouti k modelování. Máme-li zhotoviti „rekonstrukci“, nutno míti naprosto úplnou serii řezů stejné tloušťky, které nesmí býti svraštělé.

Jak na jiném místě uvedeno, hotovíme serie, na př. embryem, tím způsobem, že přiřezeme paraffin nebo celloidin, ve kterém jest objekt zalit, do hranolu; na jednu plochu, která jest uložena co možno nejbližše objektu, přiložíme v kolmém směru k řezné ploše tenounký řez měkké tkáně, na př. řez mozkem, který jsme zbarvili. V jiném případě jest možno, hlavně při paraffinovém zalití, paralelními liniemi, které při zalití do paraffinu se otisknou se skleněné podložky do paraffinu, a které potom se natrou nějakou dobře přilínavou barvou, obdržeti t. zv. orientační čáry při řezech. Orientační čára jest dána buď přiloženým řezem na plochu, nebo natřenou barvou na ploše paraffinu. Při každém řezu seřízneme onu plošku, která na řezu dá přímou čáru a která jest vždy ve stejné vzdálenosti od zalitého materiálu. Jde-li o naprosto přesné provedení rekonstrukce, pak jest výhodné označiti dvě kolmo na sobě stojící plošky, které nám dají na řezu pravý úhel.

Rekonstrukce tělesná dle Bornovy metody. Bornova rekonstrukce spočívá v tom, že na voskové ploténky určité tloušťky přenášíme kreslícím přístrojem kontury řezu tak, jak v serii za sebou následují; všechny řezy nutno kresliti při stejném zvětšení.

Kresbu na voskové ploténky provádíme buď tupou jehlou tak, že přímo do vosku ryjeme, nebo kreslíme na papír a kopírovacím papírem přetiskneme na vosk. Na ploténkách, které obdržíme z obchodu, jest vždy přilepen papír, na který možno kresliti. Jsou-li veškeré řezy, jak za sebou následují, nakresleny, pak se opatrně z vosku vyřezávají a na sebe v témže pořadu kladou. Nutno hleděti k tomu, aby ona dříve uvedená čára, kterou současně kreslíme a která udává směr a polohu řezů, byla dobře na sebe položena.

Než pokročíme dále k popisu této metody, jest nutno dříve uvéstí přípravu voskových plotének. Jest sice možno od různých firem (na př. Grübler, Lipsko) obdržeti již hotové ploténky voskové určité tloušťky, avšak mnohem výhodnější jest hotoviti si tyto ploténky takto: Použijeme plechové nebo porcelánové misky, jáké užíváme při fotografování, která má rozměr na př. 10 cm šířky, 20 cm délky. Máme v úmyslu líti ploténky voskové o tloušťce 1 mm. Krychlový obsah celé ploténky jest 20 cm^2 , měrná váha vosku jest 0.97, násobíme tudíž $20 \times 0.97 = 19.4 \text{ g}$, kteréžto množství vosku nutno vzíti na jednu ploténku. Odvážíme tudíž 19.4 g vosku, na misku nalejeme horkou vodu, která se právě přivedla do varu; mezitím roztopíme v nádobce odvážený vosk a nalejeme jej pozvolna na horkou vodu. Celý povrch vody povlékne se vrstvou vosku; nekryje-li vosk povrch vody, tvoří-li t. zv. mastná oka nebo bublinky vzduchové, tu napomáháme ohřátou lopatičkou, kterou položíme na plochu vosku a kterou rozprostíráme vosk dále po vodě, až se tato úplně přikryje. Vodu necháme pozvolna vychladnouti, při čemž vosk tuhne ovšem dříve. Jakmile poněkud ztuhl, odřízneme jej alespoň na dvou stranách od stěn misky, ke které pevně lne, a to za tím účelem, aby při dalším chladnutí a stahování nepopraskal. Jakmile voda již hodně ochladla a vosk se stal pevným, odřízneme jej na ostatních stranách, uchopíme na dvou rozích a po vyjmutí celé ploténky z misky položíme ji na rovnou plochu k dalšímu zehladnutí. Pořídíme-li si více misek, možno při nabyté zručnosti zhotoviti si potřebné množství dosti dobrých a přibližně i stejně tlustých plotének v dosti krátké době.

Mnohdy jde o naprosto přesně udanou tloušťku plotének, aby rekonstrukce nebyla v jednom neb druhém

směru nesprávná. Za tím účelem jest pořízeno náčiní, kterým možno připravit veškeré ploténky stejně tlusté. Náčiní sestává z úplně rovné, broušené skleněné desky; nejlepší jest hladce vybroušený lithografický kámen. Dále úplně hladký ocelový válec a pak as 1 cm široké plechové proužky, jichž tloušťka je přesně odměřena. Pásky tyto lze dostati a to v tloušťce 0.5—2.5 mm. Jsou-li voskové ploténky podle dříve uvedeného způsobu ulity, ohřejeme jednu v teplé vodě, položíme ji rychle na desku kamennou, kterou nutno olejem důkladně natřít, a po stranách přiložíme dva stejně tlusté pásky plechové, na př. 1 mm. Mezi oběma pásky leží vosková ploténka, kterou válečkem přejíždíme tak dlouho, až dosedne válec na pásky plechové. Tím způsobem možno vyválleti ploténky, které mají přesnou tloušťku dle síly plechových podložek. Jest samozřejmo, že možno použití i tlustých voskových plotének k vyválnění na určitou tloušťku, jen musíme k tomu přihlížeti, aby byl vosk ustavičně dosti poddajný, teplý, a nutno téměř vždy ploténku ve vodě několikráte prohráti, než je definitivně zválčována.

Vypočítávání tloušťky plotének, jaké se má upotřebiti při rekonstrukci, koná se takto: Předem nutno věděti, jak tlusté jsou řezy v serii, kterou hodláme modelovati. Řezy z paraffinu bývají 10—15 μ tlusté. Máme-li řezy 10 μ a kreslíme-li obrazy při 100násobném zvětšení, obdržíme $10 \mu \times 100 = 1000 \mu$ čili 1 mm, t. j. tloušťka jedné ploténky.

Mnohdy musí si pracovník různě vypomáhati. Tak na př. máme zhotoviti rekonstrukci při slabém zvětšení na př. 50 \times , aby se celý objekt přehlédl. V zásobě chovají se ploténky 1 mm; řezy jsou 10 μ tlusté, bylo by tedy zapotřebí plotének 0.5 mm tlustých. V tom případě použijeme tabulek 1 mm, ale při kreslení vynecháme vždy jeden řez, t. j. kreslíme první, druhý vynecháme, třetí kreslíme atd. Celková míra zvětšeného modelu musí odpovídati součtu síly všech řezů násobených 0.5. V případě opačném, kde zvětšení v daném případě by bylo 200 \times , nutno bráti všechny řezy, každý řez dvakrát vyřezávati a na sebe položit, máme-li po ruce pouze ploténky 1 mm tlusté. Model sestavíme tak, že kresby, které jsme zhotovili při jednom a též zvětšení kreslicím přístrojem Abbéovým, přenášíme v náležitém pořadí kopírovacím papírem na voskové ploténky a přenesené obrazy

pozorně vyřezáváme. Máme-li po ruce tenké ploténky, zjednodušíme si práci tak, že kresbu položíme pod průhlednou voskovou ploténku a jednotlivé obrazce z ní přímo vyřezáváme. Za účelem zachování polohy jednotlivých částic obrazu nutno současně vyřezávati spojky mezi jednotlivými výřezy a spojku k čáře směrné, dle které výřezy stavíme. Spojky vedeme na každém výřezu v jiném směru, abychom je později lehce rozeznali od vlastního modelu. (Na obr. 60. č. 7. a 11. jsou na kresbě naznačeny spojky mezi jednotlivými kanálky.) Když jest celý orgán z plotének sestaven, odstraníme spojky a model uhladíme ohrátkou železnou lopatkou.

Důležité jest, jak ploténky na sebe a za sebou klademe. Máme-li rozřezané embrya na serie a řezy jsou tak kladeny, že jdeme od hlavy směrem distálním, tu nutno výřezy voskové tímže směrem klásti; počínáme si tak, že položíme výřez nejdálší a pokračujeme s kladením ostatních řezů směrem nahoru — proximálně. Nutno tudíž předem se orientovati, jak serie za sebou jest řezána, kde jest směr distální, kde proximální. Nezachováme-li správný pořad, tu obdržíme model úplně převrácený ve všech směrech.

V jiných případech rekonstrukčních nejde tak o model, jako o kresbu. Dle daných řezů nutno mnohdy vědět, jak navzájem jsou různé útvary k sobě položeny a jak se jeví z toho neb onoho pohledu.

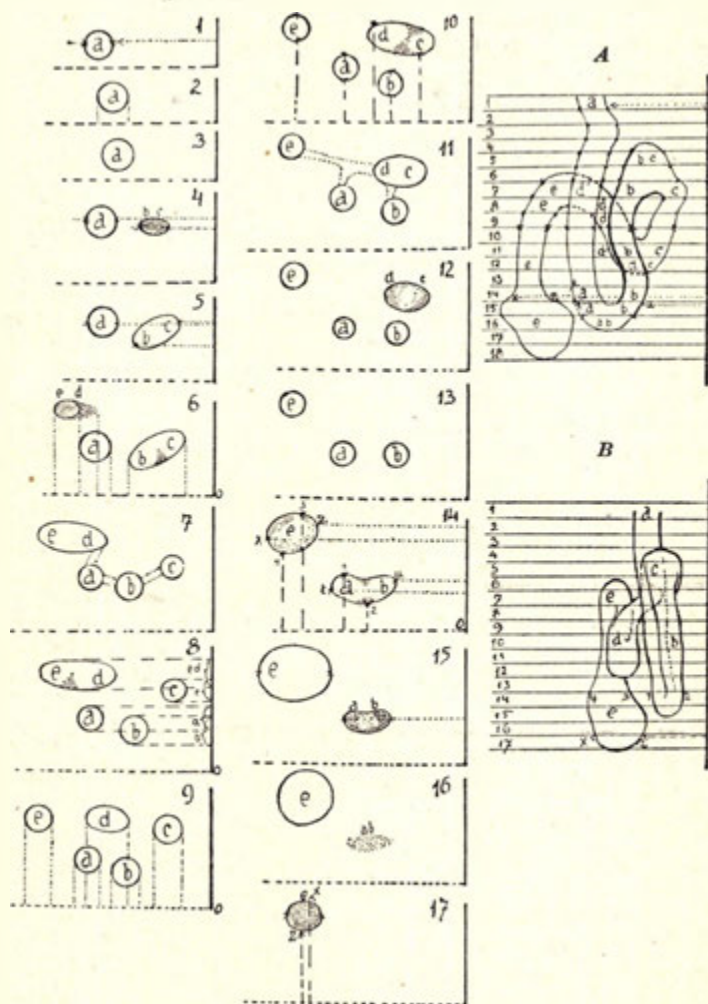
Tak na př. jde o to, stanoviti průběh a spojení nějakých vývodových kanálků navzájem v celkovém pohledu.

Serie je tak zhotovena, že jest embryo řezáno směrem proximodistálním kolmo na nejdelší osu, tudíž napříč.

Tu zhotovíme nejdříve dle řezů kreslicím přístrojem potřebnou řadu kreseb na papír s označením čáry směrné, a běžnými číslicemi poznačíme, jak řezy za sebou následují.

Nutno si připravit linkovaný papír, na kterém čáry jsou od sebe tak vzdáleny, že prostora mezi jednotlivými odpovídá zvětšené tloušťce řezů právě tak, jak bylo uvedeno pro tloušťku voskových plotének. Vhodný jest čtverečkový papír pro technické kresby, jak v obchodě přichází, kde vzdálenost čárek obnáší 1 mm. Nejlépe možno poučiti se o celé práci z přiloženého obrazce. Máme řadu projikovaných obrázků průřezů točitého kanálku (obr.

60.); na každém obrázku jest nakreslena čára směrná. Hodláme-li provésti rekonstrukci pohled se strany, tu spouštíme kolmice od nejvzdálenějších bodů kresby k přímkě směrné. Máme-li dané všechny vzdálenosti, připravíme

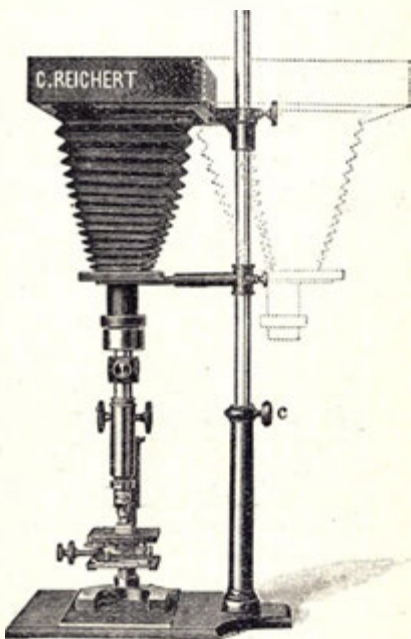


Obr. 60.

si čárkovaný milimetrový papír (1 mm vzdálenost = $100 \times$ zvětšení, jsou-li řezy 10μ), nakreslíme kolmici a počneme od ní přenášeti vzdálenosti na řezu 1. a poznačíme si udané body na 1. mezeře. Tak pokračujeme na řezu druhém, třetím atd. Body navzájem spojíme a konečný obraz nám ukazuje větší kulovitou naduřeninu ve spojení s točitým kanálkem. To jest pohled se strany levé. Pak přenášíme vzdálenosti na přímku kolmou k přímce směrné (obr. 60. č. 6.). Tyto přenesené vzdálenosti přenášíme od vodorovné přímky na papíře v kolmici, 1. řez v první mezeře na levo atd., čímž obdržíme obraz téhož kanálku z jiného pohledu. Tím způsobem jest možno hotoviti projekce v nej-různějších pohledech, vyžaduje ovšem celá práce delšího cviku. Jest to, vedle pracných modelů, nejdůležitější orientační pomůcka při studiu embryologickém. Hotovou rekonstrukci možno odstiňovati a tím docílíme naprosto dobrého plastického znázornění jednotlivých systémů, jich vzájemnou polohu atd.

XIII. Mikrofotografický přístroj.

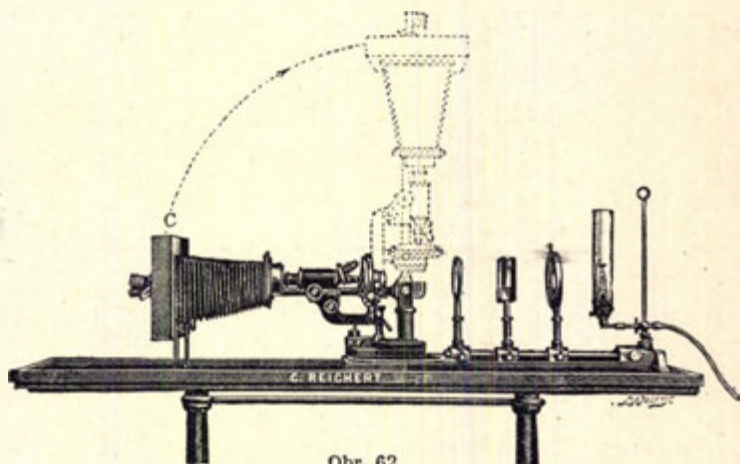
Velkého rozvoje a praktického upotřebení doznalo v poslední době mikroskopické fotografování. Všeobecného rozšíření dosáhlo se ovšem vynálezy v technické fotografii vůbec, hlavně nálezem citlivých desk pro barvy, kterých možno použítí při umělém osvětlení. Dřívější metody, kde fotografováno bylo mokrou cestou na kolidiosířbrnatých deskách, které byly jen pro sluneční světlo citlivé a citlivé jen krátkou dobu, pokud byly vlhké, bylo mikroskopické fotografování velice omezené a pracné, a výsledky neodpovídaly námaze. Vynalezením suchých desek nastal ovšem obrát; avšak nemohlo se ani tehdy všeobecně ujmouti mikroskopické fotografování, poněvadž preparáty jsou téměř vždy různě zbarvené a toto zbarvení dalo na obyčejných deskách obrazy téměř neupotřebitelné. Mělo-li se fotografovati, musil býti preparát zvláště připraven; tak na př. modře zbarvený preparát nedal skoro žádného obrazu, červeně zbarvený preparát, který v mikroskopu jevil velice pěkné barevné rozdíly, na př. mezi jádrem a plasmatem buňky, mezi vazivem atd., nebylo možno taktéž fotografovati, ježto červená barva, ať slabá nebo sytá, nepů-



Obr. 61.

sobila na vrstvu stříbra. Ještě nejlépe osvědčilo se elektivní barvení hematoxylinem neb Bismarkovou hnědí. Všem těmto nedostatkům odpomohlo se vynálezem citlivých ploten pro barvu červenou, modrou a žlutou; jsou to buď desky panchromatické nebo orthochromatické.

K mikrofotografickým pracím jest třeba vedle mikroskopu zvláštního zařízení temné komory. Jest ovšem možno použití každé komory fotografické, přizpůsobí-li se tak, aby se mohl mikroskop ke komoře připevniti, by žádné vedlejší světlo kolem mikroskopu do komory nevnikalo.



Obr. 62.

Některá komora (obr. 61.) jest tak zařízena, že jest upevněna na kolmém kovovém sloupci a možno ji velice lehce k stojatému mikroskopu nasaditi. Jiné komory (obr. 62) jsou stavěny tak, že se fotografuje ve směru vodorovném, takže mikroskop se musí ohnouti v koleně. Hodláme-li zhotoviti fotogram, počínáme si takto: Preparát připevníme svorkami pevně ke stolku mikroskopickému. Místo, které hodláme fotografovati, ostře zastavíme. Nyní nasadíme mikroskop na komoru a díváme se na obraz na visírovací desce z matného skla. Přitom musíme bráti zřetel k tomu, aby preparát byl dobře osvětlen, a rovněž zorné pole musí býti stejnoměrně osvětleno. Pro první pokusy jest nutno fotografovati pouze při malém zvětšení. Jeví-li se nám obraz na matné desce dosti ostrý, nahradíme tuto des-

kou skleněnou, úplně průhlednou; na desce této obrázků pouhým okem nevidíme, proto nutno vzít k pomoci lupu, ne příliš silně zvětšující. Zde nutno poukázat k některým důležitějším momentům. Má-li fotogram býti ostrý, dobře kreslený, jest nutno, aby citlivá vrstva desky fotografické přišla přesně na totéž místo, na kterém se jeví obraz na desce visírovací. Poněvadž však obraz může povstati buď na přední nebo zadní straně skleněné desky, nutno zastaviti lupu tak, aby nám dala obraz jevící se na ploše přední. Proto nakreslíme uprostřed průhledné desky na její vnitřní ploše (k preparátu obrácené) tuší křížek, a lupu, která jest tak zhotovena, aby se dala šroubem přiblížiti neb oddáliti od desky, zařídíme tak, aby po přiložení na zevní (zadní) plochu desky dala naprosto ostrý obraz křížku na přední straně skla nakresleného. Je-li obraz zastaven, jest další práce jednoduchá a stejná jako při obyčejném fotografování. Na místo desky visírovací vložíme kasetu s citlivou deskou a exponujeme dle potřeby kratší neb delší dobu. Důležité ovšem jest, aby kasetu byla přesně zastavena, by citlivá vrstva přišla na totéž místo, kde dříve byl obraz na průhledné desce zastaven. Jednu z nejdůležitějších úloh při mikroskopickém fotografování má osvětlení preparátu. Nejlepší osvětlení by bylo denním světlem, avšak toto jest každé doby jiné. Pracujeme-li při denním světle, hledíme bráti světlo ze světlých bílých oblaků na severní straně. Těchž v mnohém ohledu ještě lepších výsledků docílíme při světle umělém. Dle pokusů *Neuhause* doporučuje se v první řadě světlo hořáku *Auerova*, po něm následuje světlo lampy petrolejové; arganský hořák svítíplynu jest úplně nepotřebný. Taktéž nevalné jest žluté světlo elektrických žárovek; vhodné jest světlo obloukové, hoří-li ovšem stejnoměrně. Nejklidnější a ve své působnosti nejlepší jest světlo *Auerova* hořáku buď svítíplynové nebo lihové. Ve většině případů mikrofotografie hledíme docíliti monochromatického osvětlení preparátu. Jde totiž o vyloučení určitých barevných paprsků, které různě působí na citlivou desku. Proto používá se t. zv. světelných filtrů, které vyzkoušeny jsou spektroskopicky pro absorpci určitých barevných paprsků, hlavně modrých. Jsou to jednak tekutiny zbarvené žlutě nebo zeleně. Tekutinu tuto vlejeme do ploché skleněné nádoby k tomu účelu sestavené, jejíž stěny z broušeného skla stojí pa-

ralelně k sobě ve vzdálenosti 1 cm. Nádobka naplněná barevnou tekutinou nazývá se světelným filtrem a postaví se před mikroskop, takže světlo musí prostupovati filtrem. Nutno upozorniti, že chceme-li obdržeti dobrý a ostrý obraz, musí býti zorné pole v mikroskopu naprosto rovné, aby obraz při jednom a též zastavení byl jak uprostřed pole, tak i na krajích stejně ostrý. Někdy se stává, že obraz na desce visírovací byl ostře zastaven a fotografem byl přec neostrý. Jsme-li přesvědčeni, že citlivá deska nachází se v tomtéž místě jako deska visírovací, tu spočívá ona vada v samovolném pohybu mikroskopického šroubu. O tom možno se nejlépe poučiti následovně: Při silném zvětšení (u malého zvětšení té vady tak snadno nepostřehneme) zastavíme preparát úplně ostře mikrometrickým šroubem; byl-li obraz ostrý, nedotýkáme se již šroubu a hledíme do mikroskopu. Tu počne obraz před očima ztráceti ostrost, až mnohdy úplně vymizí, což jest nejlépe znatelné při immersních systémech. Dlužno opět šroubem pohnouti, abychom obraz zaostřili. Díváme-li se opět do mikroskopu, tu někdy obrázek jest ještě nedosti ostrý, jindy zůstává již po dlouhou dobu stejně ostrým. Vada ta spočívá v spiralovitě točeném péru, na které tlačí mikrometrický šroub; otočíme-li šroubem, péro se stahuje, ale svojí pružností roztáhne se opět, když jsme šroub pustili, a vzdálí poněkud objektiv od preparátu. Tu nutno po nějaké době opět obraz ostře zastaviti a po chvíli prohlédnouti, zda zůstal zaostřen. Stalo-li se tak, pak možno teprve vložit citlivou desku do aparátu a fotografovati.

Žlutý filtr tvoří kyselina pikrová a to 0.6 g na 100 g dest. vody. Při filtru žlutém nutno užiti jen achromatických desek a exponovati ještě jednou tak dlouho, jako bez filtru. Pro všechny případy vystačíme s filtrem podle Z e t n o f f a. Jest to zelený roztok tohoto složení: Skalice modré 175 g, dvojchromanu draselnatého 17 g, destillované vody 500 cc, kyseliny sírové 2 cc. Tekutina tato má barvu dosti tmavozelenou. Zastavíme-li ostře preparát při obyčejném světle a vsuneme-li před mikroskop takto zbarvený filtr, postřehneme, že ostrota obrazu se ztratila. Musíme pohnouti šroubem, abychom viděli obraz opět ostrý. Toto monochromatické zbarvení a vyloučení některých paprsků nám ukáže obrázek proti bílému světlu pošinutý více dopředu.

Pracuje-li se filtrem dle Zetnoffa, jest nutna expozice alespoň 4násobná, proti oné při světle bílém. Udati dobu, po kterou musí se exponovati, jest naprosto nemožno; každý preparát, každé zbarvení a každé zvětšení vyžaduje různé dlouhé expozice, a tu možno jen dlouhou zkušeností při přibližně stejném osvětlení nabýti eviku, jak asi ten neb onen preparát při určitém zvětšení nutno exponovati. A tu ještě často najdeme, že bylo buď krátce nebo příliš dlouho exponováno, a nutno týž preparát znova fotografovati.

Nemožno se nám na tomto místě zmiňovati o všech různých detailech, kterých nutno dbáti, a podáváme jen ve vsi krátkosti to nejdůležitější. Jak zacházeti s přístrojem mikrofotografickým, o tom podává každá firma důkladný návod a bližší vysvětlení; theoretický výklad o tomto thematě nalezneme v různých pojednáních. Velice dobrou příruční knihou jest příručka od Neuhause.

Na tomto místě nutno zmíniti se jen krátce o novém přístroji mikrofotografickém, který sestaven firmou Zeissovou v Jeně, kde fotografuje se jen paprsky ultrafialovými. Jest to přístroj velice komplikovaný, kde se světlo elektrické jiskry rozloží hranolem nejdříve ve složku spektrálního vidma, z tohoto vidma vybere se jiným hranolem jen část fialová a ultrafialová a konečně jen paprsky neviditelné ultrafialové, které se vedou přímo do mikroskopu. Poněvadž však paprsky ultrafialové neprocházejí sklem, jest celé zařízení mikroskopických čoček objektivů i okulárů z čistého křišťálu; z téhož materiálu musí býti zhotoveno i podložní a krycí „skélko“. Ostré zastavení preparátu při ultrafialových paprscích jest pouhým okem nemožné; tu musí dopadati paprsky na určité připravenou deštičku, na které možno jen asi přibližně preparáty zastaviti. Aby se docílilo správného obrazu, jest kasetta u tohoto přístroje tak zařízena, že nalézají se v ní tři citlivé desky za sebou uložené a exponují se tři snímky, a to tak, že po prvním snímku otočí se něco málo šroubem mikrometrickým dolů, udělá se druhý snímek a pak opět se točí opačným směrem vzhůru a zhotoví se snímek třetí. Tím způsobem fotografují se tři vrstvy preparátu a pak se vyhledá onen obraz, který jest nejostřejší. Exposice těmito paprsky jest velice krátká, jen zlomky vteřiny. Přístroj tento jest velice důmyslně sestaven, avšak jest jen úzký obor badání, kde bude možno přístroje toho

použití. Při histologickém, embryologickém a podobném badání jest nutno míti nejdříve řadu preparátů, které musí býti prostudovány a určitá místa z těchto preparátů nutno zobraziti, fotografovati.

Preparáty na skle montované, dále preparáty zbarvené (bez barvení nemožno se téměř vůbec obejít) nelze fotografovati ultrafialovými paprsky. Již jen z těchto důvodů, nehledě ani k ceně tohoto přístroje, jest možno za to míti, že zůstane prozatím přístroj ten cenným vynálezem fysikální optiky a nenalezne širšího upotřebení. Obšírný popis přístroje a práce nalezne čtenář ve článku prof. Kruise v „Živě“ 1907.

XIV. Barvení mikroorganismů.

Jen krátce hodlám se zmíniti o barvení, kterého se užívá v bakteriologii. Náleží to sice do samostatné kapitoly, která pojednává o bakteriologickém vyšetřování, očkování, hotovení různých pūd atd., avšak přesto uvádím alespoň nejdůležitější způsoby barvení pro bakteriologická vyšetřování, která jsou pro každého lékaře v denní praxi nutná.

Pouhým barvením možno rozpoznati jen velice nepatrný počet bakterií; u většiny jest nutno očkovati na pūdy, a teprve dle vzrůstu a zabarvení kolonií, nebo dle působení bakterií na pūdy různě připravené nebo zabarvené atd. možno ten který druh diagnostikovati.

Vyšetření na přítomnost mikroorganismu v různých tekutinách tělních, krve, moče, chrchlů, hnisu atd. provádíme tím způsobem, že kapku vyšetřovaného materiálu rozetřeme na krycím nebo podložním skélku, necháme na vzduchu uschnouti, a po usušení ještě fixujeme buď teplem nad plamenem nebo fixačními tekutinami.



Obr. 63.

Ve většině případů stačí pro rychlou orientaci pouze fixace teplem.

Na takto připravený materiál nakápneme některé z dehtových (anilinových) barev. Ponejvíce se používá: fuchsinu carbol-fuchsinu nebo methylenové modři. S výhodou možno použití soupravy lahvíček s barvami, které mají zátky s pipetami (obr. 63.).

Nejdůležitější barviva v bakteriologii používaná.

L ö f f l e r o v a methyln. modř alkalická :

| | |
|------------------------------------|---------|
| Konc. vodný roztok methylové modři | 30 ccm |
| Louh draselnatý | 0.01 g |
| Dest. voda | 100 ccm |

Doba barvení jest libovolná, preparát vymýváme v 1% kys. octové, přeneseme do alkoholu, xylolu a do pryskyřice.

| | | |
|-------------|-----------------|---------|
| K ü h n e : | Methylová modř | 1.5 g |
| | Alkohol absol. | 10 ccm |
| | Karbol. voda 5% | 100 ccm |

G r a m m. Barvivo připravíme takto: V eprouvettě protřepeme anilinový olej s vodou, až povstane emulze, kterou filtrujeme přímo do koncentrovaného vodného roztoku gentianové violeti. Anilinovou vodu vkapujeme do barvy tak dlouho, až povstane na jejím povrchu kovově lesklý povlak.

Takto připravené barvivo nakapeme na preparát, barvíme 1—5 minut, barvivo odkapeme a preparát osušíme filtračním papírem. Po osušení nakapeme naň rychle Lugolův roztok, ponecháme jej $\frac{1}{4}$ —1 minutu, při čemž preparát zhnědne. Potom roztok odkapeme, preparát opět osušíme filtračním papírem a přeneseme k odbarvení do alkoholu, kde odbarvujeme tak dlouho, až preparát stane se světle šedým, načež jej přeneseme přes xylol do pryskyřice.

W e i g e r t o v a metoda odpovídá úplně metodě Grammové, pouze při odbarvování použijeme místo alkoholu směs anilinového oleje-xylolu. Odbarvujeme preparát tak dlouho, pokud odcházejí z něho barevné vločky, načež přeneseme ho do xylolu a kanady.

Touto methodou možno zbarviti pouze bakterie, fibrin a plísňe, vše ostatní zůstane nezbarveno, takže jest.

nemožno postřehnouti ostatní tkáň. Chceme-li mít i tkáň zbarveny, jest nutno dříve preparát „předbarviti“ nějakou kontrastní červenou barvou. Nejlépe se osvědčila kamencová košenila, kamencový karmín a pirokarmín.

Barvení tuberkulosních bakterií.

Methoda Ziehl - N e h l s e n o v a. Barvíme karbolovým fuchsinem a jako kontrastního barviva použijeme methylové modři.

| | |
|------------------------|---------|
| Fuchsin (pro bakterie) | 1 g |
| alkohol | 10 ccm |
| konc. kyselina karbol. | 5 ccm |
| destilovaná voda | 100 ccm |

Preparát barvíme v karbolovém fuchsinu při obyčejné teplotě 24 hodin, při zahřátí barvy až do varu 5 minut. Po zbarvení ponoříme preparát do 5% kyseliny sírové nebo 15% kys. dusičné, kde barva téměř okamžitě vymizí, načež jej protáhneme 70% alkoholem a zbarvíme vodovým roztokem methylové modře (asi 2 min.). Alkohol, xylol, balsám.

Methoda dle G a b e t t a spočívá v tom, že barvíme karbolfuchsinem (Gabett I.), který odbarvíme kyselým roztokem methylové modři (Gabett II.).

Používáme tudíž dvou barev, z nichž kontrastní zároveň odbarvuje. Předpis pro kyselý roztok methylové modři :

| | |
|---------------------|--------|
| Methylová modř | 2 g, |
| 25% kyselina sírová | 100 g. |

Nejprve barvíme asi 2 minuty Gabett I., omyjeme ve vodě a barvíme asi 1 minutu 1 v Gabett II., při čemž červená barva zmizí. Potom preparát opět omyjeme vodou; objeví-li se červené zabarvení, barvíme ještě jednou Gabett II., a přeneseme přes alkohol a xylol do balsámu. Sklíčka s nátěrem po omytí ve vodě usušíme a přímo uložíme do kanady. Tuberkulosní bakterie jsou zbarveny červeně, tkáň modře. Jako bakt. tuberkulosní barví se i bacily lepry.

C z a p l e v s k y. Jemný nátěr barví se as 1 minutu karbolovou genciánou při slabém zahřátí. Opere se vodou a poleje Lugolovým roztokem na dobu 30—60 vteřin. Opláchne se vodou, differencekuje alkoholem tak dlouho,

až nevystupují více žádné barevné vložky (asi 1 minutu). Po případě možno přidati jednu kapku anilin-xytolu. Nátěr dobarví se zředěným karbol-fuchsinem 1 : 10, (mírně se zahřeje). Opláchne se vodou a usuší.

Gonococcus barví se různými barvivý a možno jej v nátěrech velice lehce rozeznati. Platinovou kličkou rozetřeme kapku podezřelého sekretu (hnisu) na skélku, na vzduchu osušíme a zbarvíme Löfflerovou methylovou modří.

Lanz barví gonokokky ve směsi 1 dílu nasyceného roztoku fuchsinu ve 2% karbolové vodě a 4 dílů nasyceného roztoku thioninu ve 2% karbolové vodě. Ve směsi těchto dvou barev ponechá preparát asi 1/2 minuty a po opláchnutí ve vodě a usušení uloží do kanadské pryskyřice. Gonokokky jsou zbarveny modře, hnisavé buňky červeně, epithelie ohnivě červeně.

Velice výhodné a rychlé jest barvení směsí Unna-Pappenheimovou (methylová zeleň-pyronin). Po zbarvení jsou jádra modrozelená, hnisavé buňky světle červené, gonokokkus svítí intensivně červeně.

Dlužno uvést, že gonokokkus jest gramm-negativní, nezbarví se Grammovou nebo Weigertovou methodou a nutno jej dodatečně zbarviti (vesuvinem a j.).

Plísň barví se nejlépe Grammem nebo Weigertovou methodou.

Spirochaete pallida Schaudin. Vyšetřování spirochaet řídí se dle materiálu; jde-li o vyšetření sekretu, možno natřené a usušené skélko barviti methodou dle *Giemsy* (viz tuto), nebo vyšetřovati za čerstva v temném poli, nebo konečně Burriho methodou, kterou provádíme tím způsobem, že na kapku sekretu na podložním sklíčku nakápneme kapku tekuté čínské tuše, kterou se sekretem smísíme. Po uschnutí preparátu jsou spirochaety bílé v černém poli. V tkáních barvíme spirochaety methodou *Levaditiho*. Tenké a malé kousky orgánu fixujeme 12—24 hodin v 10% formalinu, pak přeneseme materiál asi na 15 hodin do 96% alkoholu, z alkoholu do dest. vody, kterou několikrát vyměníme, až řezy klesnou ke dnu. Potom zavěsíme kousky na niti v temné láhvi ve směsi :

| | |
|-------------------------------------|--------|
| 1.5% vodný roztok dusičnanu stříbr. | 90 ccm |
| čistý pyridin | 10 ccm |

V tomto roztoku ponecháme kousky při teplotě 37° 1—6 dnů, pak je krátce opereme (v 10% pyridinu) a přeneseme do čerstvé směsi: 90 ccm čerstvě připraveného 4% vodného roztoku pyrogallolu a 10 ccm acetonu. Z této směsi připravíme si žádanou takto:

| | |
|-------------------|--------|
| Pyrogall + aceton | 85 ccm |
| pyridin čistý | 15 ccm |

V tomto složení ponecháme preparáty 15 hodin až 2 dni (ve tmě!).

Po redukci stříbra vypíráme kousky v dest. vodě, přeneseme do alkoholu a známým postupem zalijeme do paraffinu. Spirochaety jsou v řezu černé, tkáň světle žlutohnědá.

Ricci. Jednoduché barvení spirochaety pallidy. (Lo sperimentale čís. 5—6 1922). Autor používá Thymol-Victoria-Blau od fy Grübler, barvicího roztoku dle předpisu:

| | |
|----------------|---------|
| Victoria-Blau | 1·0 g |
| Thymoli | 0·2 g |
| Methylalkoholi | 30·0 g |
| Aq. destil. | 100·0 g |

Skličko podložní s nátěrem zkoumaného materiálu se lehce fixuje nad plamenem, potom se na ně nakape několik kapek barviva a zahřívá se lehce až do objevení páry. Omyje se, usuší, a pozoruje imersí. Všechny germi preparátu jsou zbarveny modře, více nebo méně intenzivně. Treponema pallida přijímá zabarvení oblohy, které se stává zřejmějším ve srovnání s jinými spirochaetami, které se barví intenzivně modře, skoro fialově. Tato metoda jest rychlá a dává jasnější obrazy než barvení giemsou. Kromě toho má tu výhodu, že ponechává intaktními formy i rozměry spirochaet, čímž jest odstraněna hlavní nevýhoda všech method založených na impregnaci stříbrem.

Giemsa, barvení parazitů malarie (Centrbt. f. Bacter. XXXII. 1902).

Krví natřená sklička na vzduchu usušená a alkoholem fixovaná položíme vrstvou dolů na mističku se směsí roztoků azuru I. a eosinu.

První roztok jest 0·8 g azuru I. (Grübler) na 1000 ccm dest. vody, druhý roztok jest 0·05 g eosinu na 1000 ccm

dest. vody (Eosin Höchst extra). Před barvením smísíme 10 ccm slabého eosinu s 1 ccm azuru. Barvení trvá 15 až 20 minut, nato se sklíčka ve vodě opláchnou, na vzduchu usuší a montují do kanadské pryskyřice. Toutéž methodou barví se trypanosoma.

A moeby ve stolici a jich barvení. Wiener (Arch. f. Protistenkunde 1918). Malý kousek hleny přesune se lehce na podložní skélko, na vzduchu usuší a přeleje methyl. alkoholem. Pak vloží se preparát na 5 minut do 1% jodové tinktury, opláchně ve vodě a obarví se Loefflerovou modří (as 1 minutu), opláchně se ve vodě a dobarvuje se dále slabým eosinem (po 1 minutu). Opláchně se vodou a usuší filtračním papírem. Kanadská pryskyřice.

Sikora H. Seriové řezy z *Pediculus* vest. a jiných malacophagů. (Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene).

Fixování preparátů nejlépe provádíme ve směsi van Leeuwen;

- 12 dílů 1% pikrové kys. v alkoholu abs.
- 2 díly formolu
- 2 díly chloroformu
- 1 díl kysel. octové.

Tato tekutina zachovává nejlépe ssavý aparát, vniká rychle, ale jest nutno břišní část, jakož i nožky (hlavně drábký), které při řezání kazí nůž, odříznouti.

Velice dobře konservuje též sublimát (konec. roztok).

Zalévání.

Samotné zalití do paraffinu, jakož i do celloidinu jest naprosto neupotřebitelné; nutno zalévati do paraffin-celloidinu dle Apatiho. Materiál se vloží do 0.5% pak do 2% a konečně do 4% celloidinu a utvrdí se v parách chloroformu. Pak se odstraní všecken aether-alkohol v tekutém chloroformu načež se vloží do směsi olejů: 4 díly chloroformu (dle váhy), 1 díl karbol. kyseliny kryst., 4 díly cedrového oleje, 2 díly origanského oleje a 1 díl abs. lihu. V této směsi se ponechá materiál, jenž byl v celloidinu zalit, as 3 hodiny; za tuto dobu se 3krátě směs změní, načež se oleje musí důkladně vyčistiti v benzolu (as po 6 hodin, při čemž se musí benzol několikrátě změnit). Veškerá stopa vody musí býti odstraněna, jinak nastane svrašštění. Nato se vloží materiál na 12 hodin do

paraffinu při 57° tavení. Řezy as 4 μ lepí se na glycerinový bílek a uloží k uschnutí. Barví se nejlépe G i e m s o u, jádra jsou velice dobře k rozeznání od ostatního plasma, a zároveň jsou dobře zbarveny mikroorganismy. Před barvením nutno odstraniti paraffin i celloidin z řezů. Je-li materiál fixován sublimátem, tu musí se řezy přenést z alkoholu silného do slabšího až do vody, a pak do jodkalie. Řezy se barví po 6 hodin v roztoku G i e m s a (2 kapky na 2 cc vody). Differencování provádí se za mikroskopické kontroly nejdříve v neutrálním acetonylolu (za příčinou odstranění červených sraženin) nato pak v acetonylolu (20 *ccm*) s přidáním 1 kapky 1% uhlíčitanu sodnatého.

V o g e l R. (Zoolog. Jahrb. 1921). Autor uvádí, že obdržel dobré řezy z pediculus vest. po tvrzení v 60% alkoholu, načež veš byla rozdělena na menší části a tyto vloženy do absol. lihu, který byl několikrát změněn, na 4 hodiny. Z alkoholu byly přeneseny do chloroformu, který byl taktéž několikrát vyměněn. Poté se do chloroformu přidá paraffinu. Chloroform nechá se pomalu odpařiti a materiál se přenesse do čistého paraffinu, co možno tvrdého. Tato metoda je velice jednoduchá a možno hotoviti řezy 3—5 μ .

XV. Sbírání planktonu.

Chceme-li sbírat mikroskopickou faunu našich vod, počínáme si různě. Nejjednodušší způsob je ten, že nabere do láhve se širokým hrdlem nebo do hluboké misky vodu, ve které opíráme celé trsy vodních rostlin. Jindy vytrháme kořeny vodních rostlin a oplachujeme je i s bahnem. Tím způsobem dostaneme hojnou kořist, o čemž se můžeme již jednoduchou lupou přesvědčiti. Chceme-li sbírat plankton plovoucí (na př. v rybnících), zaopatříme si tak zv. sáček planktonový. Tento jest zhotoven z velmi jemného t. zv. mlynářského plátna; na jeho zúženém konci jest kovová objímka, do které možno vložit a bajonetovým uzávěrem upevniti kovovou nádobku, ve které jest uložena nádobka skleněná. Sáček připevněn jest k delší dřevěné hůlce. Protáhneme-li sáček vodou, tu při vytažení sáčku voda odtéká a ve skleněné nádobce zachytí se vodní fauna, kterou vylejeme do připravené větší skleněné nádobky a lovení opakujeme. Hodláme-li prohlížeti faunu v náplavu rybníků, použijeme sáčku, který má dvě sítky, jednu se širokými, druhou s jemnými oky. V první síťce, s velkými oky, zachytí se všechny velké předměty jako kameny, větvičky atd. V druhé síťce zachytí se menší hmoty a na stěnách třetí jen nejjemnější naplavenina s faunou.

Pro faunu jezerní a mořskou jsou sítky různě sestaveny, hlavně pro lovení v různých hloubkách. Takové sítky opatřeny jsou závažím a spouštějí se po provazech do určité hloubky, ve které nutno vyšetřovati. V žádané hloubce otevře se teprve nádobka, po nějakou dobu sítku táhneme ve vodě, pak nádobku uzavřeme a vytáhneme nad vodu. Není zapotřebí šíře se zmiňovati o různých zařízeních potřebných pro taková vyšetřování, jelikož ve všech přímořských vyšetřovacích stanicích jsou veškeré pomůcky po ruce.

Mikroskopické vyzkoušení planktonu děje se za čerstva tak, že pipetou nakápneme vodu, ve které nalézá se

plankton, na podložní sklíčko a na kapku přiložíme skélko krycí. Abychom nepoškodili přiložením skélka objektů, podkládáme pod krycí skélko, jak bylo již dříve uvedeno, kousek hedvábného papíru, vlas, úlomek krycího skélka atd. (viz vyšetřování za čerstva).

Chceme-li nasbírané organismy konservovati, dlužno je nejprve pomalu narkotisovati, jelikož jinak se v konservačních tekutinách k nepoznání změní. Narkotisujeme tím způsobem, že pipetou přeneseme zvířenu do vody, ve které jest jen stopa chloroformu. V eprouvetě protřepeme vodu s několika kapkami chloroformu, necháme ustáti. Chloroform se oddělí od vody, slejeme čistou vodu a stopy chloroformu v ní obsažené stačí úplně k narkose. Jak důležitá jest narkosa, o tom nejlépe se přesvědčíme na exemplářích hydry (*H. viridis*, *grisea*); po narkose vidíme, že chapadla zůstala vychlípena a celý živočich jest normálně vytažen, jinak se bez narkosy v konservačních tekutinách stáhne v kuličku. Někdy stačí na omámení kouř z doutníku nebo cigarety, který foukneme na hodiňové sklíčko s vyšetřovanou vodou, a které jiným skélkem přikryjeme, aby kouř neunikal.

Konservaci možno provést nejlépe nasyceným vodným roztokem sublimátu s přidáním kyseliny octové; ku konservování horkým roztokem stačí doba 15 až 30 vteřin, studeným 15 minut až 1 hodina. Potom možno přenést materiál ihned do alkoholu. Rovněž velice pěkně konservuje kyselina osmičelá.

Barvení živých protozoí (viz str. 52.).

Vyšetřování řasinek u různých mikroorganismů možno nejlépe prováděti přístrojem pro osvětlení v temném poli (viz str. 35.).

XVI. Zředování lihu vodou při 15° C.

Výpočet v tabulce na str. 221, sestaven tak, že ukazuje, kolik dílů vody jest nutno přidati ku 100 dílům základního alkoholu, bychom dosáhli žádaného stupně zředění. Na př.: Potřebujeme líh 70%, základní jest 90%, nutno ku 100 *ccm* 90% lihu přidati 31.05 *ccm* vody; je-li základní líh 80%, stačí již 15.35 *ccm* vody.

L ö w i udává velice jednoduchou metodu ku zředování základních roztoků na určité procento. Dle něho nalijeme do odměrného válce tolik dílků (*ccm*) základního roztoku, kolik procent má rozředěný roztok obsahovati, a rozředovací tekutinou naplníme válec do tolika dílků (*ccm*), kolik procent základní roztok obsahoval. Na př. ze základního 96% alkoholu pořídíme 38% zředění tak, že ku 38 *ccm* původního 96% alkoholu nalijeme do 96 *ccm*, t. j. 58 *ccm* vody.

| Zředěný má míti % | | Základní alkohol měří % | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|--|--|
| | | 90 | 85 | 80 | 75 | 70 | 65 | 60 | 55 | 50 | | | |
| Sp. v. | % | 410-883 | 0-849 | 0-863 | 0-876 | 0-889 | 0-901 | 0-913 | 0-923 | 0-933 | | | |
| 0-849 | 85 | 6-56 | — | — | — | — | — | — | — | — | | | |
| 0-863 | 80 | 13-79 | 6-83 | — | — | — | — | — | — | — | | | |
| 0-876 | 75 | 21-89 | 14-48 | 7-20 | — | — | — | — | — | — | | | |
| 0-889 | 70 | 31-05 | 23-14 | 15-35 | 7-64 | — | — | — | — | — | | | |
| 0-901 | 65 | 41-53 | 33-03 | 24-66 | 16-37 | 8-15 | — | — | — | — | | | |
| 0-913 | 60 | 53-65 | 49-48 | 35-49 | 26-47 | 17-58 | 8-76 | — | — | — | | | |
| 0-923 | 55 | 67-87 | 57-90 | 48-07 | 38-32 | 28-63 | 19-02 | 9-47 | — | — | | | |
| 0-933 | 50 | 84-71 | 73-90 | 63-04 | 52-43 | 41-73 | 31-25 | 20-47 | 10-35 | — | | | |
| 0-943 | 45 | 105-34 | 93-30 | 81-38 | 69-54 | 57-78 | 46-09 | 34-46 | 22-90 | 11-41 | | | |
| 0-951 | 40 | 130-80 | 117-34 | 104-01 | 90-76 | 77-58 | 64-48 | 51-43 | 38-46 | 25-55 | | | |
| 0-958 | 35 | 163-28 | 148-01 | 132-88 | 117-82 | 102-84 | 87-93 | 73-08 | 58-31 | 43-59 | | | |
| 0-965 | 30 | 206-22 | 188-57 | 171-05 | 153-61 | 136-04 | 118-94 | 101-71 | 84-54 | 67-45 | | | |
| 0-970 | 25 | 266-12 | 245-15 | 224-30 | 203-53 | 182-83 | 162-21 | 141-65 | 121-16 | 100-73 | | | |
| 0-975 | 20 | 355-80 | 329-84 | 304-01 | 278-26 | 252-58 | 226-98 | 201-43 | 175-96 | 150-55 | | | |
| 0-980 | 15 | 505-27 | 471-00 | 436-85 | 402-81 | 368-83 | 334-91 | 301-07 | 267-29 | 233-64 | | | |
| 0-986 | 10 | 804-54 | 753-65 | 702-89 | 652-21 | 601-60 | 551-06 | 500-59 | 450-19 | 399-05 | | | |

SEZNAM JMEN.

- Abbé 12, 13, 20; -ův kreslicí přístroj 27; -ův osvětlovací přístroj 14, 23
 Alkohol 62; -ové karmíny 134; ~ kys. octová 62; ~ Ranvierův 74
 Ammoniakální karmín 134
 Ammonium molybdenicum 164
 Amoeba ve stolici 216
 Anilinová modř 143
 Anilinový olej 138
 Anilinová voda 138
 Anthrapurpurin 72
 Apathy ~ nervstvo 173
 Argentum nitric. osový válec 148
 Assmann granula 182
- Babes** ~ safranin 138, 139
 Barvení adjektivní 124; ~ centr. nervstva 148; ~ difusní 124; ~ dvojité 140; ~ mikroorganismů 211; ~ osového válce nervů 148, 154; ~ plasmatu buněčného 140; ~ preparátů 123; ~ progresivní 124, 137; ~ regresivní 124; ~ substantivní 124; ~ tuberkulosních bakterií 213; ~ tuku 177; ~ v celku 124; ~ za čerstva 50
 Barviva dehtová (anilinová) 135; ~ haematoxylinová 126, karmínová 131
 Beale ~ zažívání 76
 Benda modifikace Van Giesona 143; ~ periferní nervy 153
 Bensol 99; ~ alkohol 99
 Berlinská modř gelatina 191; ~ rozpustná 190; ~ injekce 190
 Bernard centr. nervstvo 153
 Bestův karmin 176
 Bethe neurofibrilly 162
 Bielschowski, nervstvo 158, 159, 167
 Bílek k lepení 117
 Bílení 76
 Bílkoviny, barvení 185
 Biondiho barvivo 144
 Bismarkova hněd 139
 Bleu de Lyon 143
 Blue-black, gangl. buňky 161
 Boedecker, odvápnění 71
 Boehmer haematoxylin 126
- Bornova rekonstr. metoda 199
 Botanické reakce a barv. 184
 Burri spirochaeta 214
 Boneziova tekutina 64
 Borax-ferrieyankalium 149; ~ -karmin 134
 Brunk zalévání 102
 Bumpus celloid paraffin 103
 Buničina, reakce 184
 Butterfield-granula 182
 Bütschli haematoxylin 128
- Camera lucida 36
 Cajal S. R. neurofibrilly 165
 Carazzi haematoxylin 128
 Celloidin 95; ~ paraffin 103
 Ciechanovski, barvení 180
 Clonky 21
 Conheim, chlorid zlatnatý 170
 Corning, neurokeratin 147
 Czapevsky, barv. tbc. bakt. 213
 Czokor-košenilla 132
- Čočky achromatické 27; ~ aplana-tické 11, 27
- Dahlia** 139
 Damarská pryskyřice 46
 Dantschakoff, řezy celloid. 111
 Dehtová barviva 135
 Delafieldův haematoxylin 128
 Demonstr. okulár 26
 Dioxyhaematein 130
 Dogiel, nervstvo 173
 Drasch, impregnace zlat. 169
 Dřevovina, reakce a barv. 184
- Eau de Javelle 67, 77
 Edingrův přístroj 39
 Ehrlich, gentiana 139; ~ haematoxylin 127; ~ -ova metoda barvení nervů methyl. modří 171; modř 52; ~ -ův triacid 144, 180
 Elastická tkáň 173
 Ellermann, granula 183
 Eosin 140
 Erlickiho tekutina 59

- Fibrin**, barvení 176
Field-Martin, celloid. paraff. 103
Fischer 54, 55, 56; ~ granula 182
Fixování preparátů 53
Flemming 54, ~ safranin 138; -ova tekutina 56
Formol 62, ~ kys. pikrová 64, ~ Müllerova tekutina 63, ~ odstranění sraženin 63
Fosfáty, barvení 72
Fränkel-fibrin 176; ~ nervstvo 152
Frey, haematoxylin 127
Fysiologický roztok 45

Gabett, barvení tuberk. bakt. 213
Gangliové buňky spinální 161 ~ buňky centrální 160
Gauk lepení řezů 118
Gehutchen van, gangl. buňky 161
Gelatina 47; ~ čištění 47; ~ injekce 188; ~ stříbrná dle Hoyera 192; ~ -ové plotny karninové dle Krause 189
Gentianova violet 139
Gillsonova tekutina 161
Giemsa, barvení 180
Giesbrecht, lepení řezů paraff. 117
Gieson van, směs barev 142
Glycerin 45
Golgiho metoda 162
Gonococcus 214
Gramm barvení mikrobů 212
Greenough, stereosk. mikr. 25
Grenacher, bílení 77; ~ borax karmin 134; ~ Mayer, karmin s kys. solnou 135
Gummový roztok k lepení řezů 117

Haemacalcium Mayer, 128
Haematein 129
Haematoxylin Böhmer 126; ~ Delafield 128; ~ Hensen 129, ~ jodjodkali 128, ~ kamencový Frey 127, ~ Kultschicki-Wolters 131, ~ kyselý, Ehrlich 127, ~ Rochl 72, ~ Weigert 130, ~ zrání 126
Heidenhain, barvivo 144
Heimstaedt, stereo-mikroskop 26
Helly ~ impregnace 162, ~ granula 183, ~ Maximova tekutina 61
Henningsova tekutina, chitin 68
Hensen, haematox. 129, ~ košenilla 132
Herringův přístroj, injekce 166

Hermann, dehtová barviva 123, -ova tekutina 61
Hofker, fixace 66
Hoyer, gelatina stříbrná 192
Hyalin, barvení 176

Chilesotti, barvení os. válece 154, 157
Chitin 67
Chloralhydrát, macerování 75
Chlorid zlatnatý 169
Chromatická vada 11, 27
Chromo-kamencový dioxyhaematein 130
Chromová kyselina 59, 74
Chromogen 168

Illuminator 25
Immerse 15
Impregnace chlorid. zlat. 169, ~ osových válců 158
Indig-karmin 144
Indulin 142
Injekční metoda mikroskop. 187, ~ pro vyšetřování Roentgenem 198
Injekční přístroj Herringův 194, ~ Ludwigův 193, ~ Ranvierův 194

Janošik 54
Jednoduchý mikroskop 19
Jehly preparační 43
Jennerovo barvivo 179
Jodserum 45, 75
Jodjodkali Lugol 176

Kanadský balsám 46
Kapka visutá 52
Kaplan, centr. nervstvo 156
Karmin 131, ~ Bestův 176, ~ boraxový 134, ~ gelatina, injekce 187, ~ kamencový 132, ~ s kys. solnou 135
Karmkameneč 133
Kaiserling 67
Klebsův nůž 52
Kleinebergova tekutina 64
Kofler, montování preparátů 46
Kollagení vazivo, barvení 175
Kolofonium benzol 47
Komorová voda 45
Komůrky na zalévání 100
Korek, reakce a barvení 185
Košenilla černá, Hensen 132 ~ Czokor 132

- Košíčky na serie 121
 Krause, gelat. massa červ. 189
 Kreibisch, rongal. běl 172
 Kreslici přístroj Abbé 37
 Krevní preparáty sušené 177, ~ za čerstva 51
 Krycí skélka 14, 15, 90
 Kühne, impreg. zlat. 171, ~ meth. modř, bakterie 212
 Kultschicki, barvení 152, ~ Wolters, haematox 131, ~ tekutina 59
 Kuskow, zažívání 76
 Kyselina dusičná 62, ~ macer. 74, ~ ředění 71, ~ chromová 59 ~ octová 45, ~ octová-chromová 60, ~ octová s osmičelou 56, ~ osmičelá 56, ~ pikrová 141, ~ pikrová sírová 64, sířičitá 71, sírová 75, ~ solná macer. 74, ~ solná odvápnění 71, ~ solná bílení 77, ~ trichloroctová 66
 Lanc, gonococcus 214
 Látky přechodné, paraffin 99
 Lenhossek, gangl. buňky 161
 Lepení řezů celloid., bílek 111
 ~ paraffinových nezbarvených 116
 ~ barvených 116
 Levaditi, spiroch. pallida 214
 Lih, ředění 220
 Lithiový karmin 135
 Lithium carb. Weigert 150
 Locle, barvení granul 181, ~ oxydasy 183
 Lopatičky 44
 Louh draselnatý, macer. 74
 Löfflerova meth. modř. alk. 178, 212
 Löwit, chlor. zlat. nervy 170
 Löwi, ředění lihu 220
 Ludwigův injekční přístroj 193
 Lugolův roztok 176
 Lupy 19
 Macerování 73
 Magnesia karmin 133
 Mallory, osově válce 155
 Mann, gangl. buňky 161
 Marchiho metoda, nervy 154
 Martinotti, elastická tkáň 173, ~ granula 181, ~ nervstvo 161
 Maximova tekutina 58, ~ Zenker 58
 May-Grünwald 182
 Mayer P., bílení chlorem 76, ~ bílek k lepení 117, ~ haemacalcium 128, ~ karmkamének 133, ~ indigkarmin 144, ~ magnesia karm. 133, ~ odvápnění 71, ~ parakarmin 135, ~ triacid 145
 Metachromasie 125, 145
 Methylový alkohol, macer. 74
 Methylenová modř 146
 Methylová zeleň 140
 Michaelis, paraffin 119
 Mikrofotografie 205, ~ Zeiss ultrafialové paprsky 209
 Mikrometer okulární, objekt. 16, 18, 40
 Mikroskop 20, 25, ~ ultra 34
 Mikrotom 80, ~ Albrechtův 82, ~ Beckerův 83, ~ Jungův 81, ~ Minotův 86, ~ Ranvierův 80, ~ Reichertův 82, ~ Rivertův 81, ~ Rocking 85, ~ nože 88, ~ Sartorius 88
 Möllendorf v., barvení 175
 Montování preparátů 90, ~ velkých řezů 94
 Mořidlo Weigertovo 149
 Mucin, barvení 176
 Müller v. barvení krve 170
 Müllerova tekutina 59, ~ formol 63, 74
 Myelin, osmium 147, ~ Weigert 148
 Nabias, centr. nervstvo 157
 Narovnač řezů paraff. 120
 Narovnání řezů paraff. na teplé vodě 119
 Nativní preparáty 53
 Neapolská vodní lázeň 102
 Němec, barvení škrobu 186
 Neurofibrilly 162
 Neuroglia 168
 Neurokeratin 147
 Nigrosin 143
 Nissl, gangl. buňky 160
 Numerická apertura 12
 Objektivy 10, ~ achromatické 29, ~ apochromatické 29, ~ immersní 30, ~ korekční 30, ~ semiapochromatické 31
 Oberhäuserova komora kreslici 36
 Octan měďnatý neutr. 149
 Odbarvování (bílení) 76

Odbarvovací tekutina Weigertova 149

Odvápňování 69

Okajima, barvení tuku 177

Okular, Huygenský 28, ~ kompen-
sační 12, ~ mikrofotograf. 28,
~ periplanatický 28, projekční 28,
~ demonstrační 26

Olaj bergamotový 46, ~ cajeputový
160, ~ hřebíčkový 46, ~ origan-
ský 46

Olt lepení řezů celloid. 112

Orámečkování preparátů glyc. 93

Oranž G. 142

Orgány lymfoidní, barvení 180

Orthova fix. tekutina 63

Orthův lithium karmin 134

Osmičelá kyselina myelin 147

Osový válec ~ nervy 147

Oxydasy 183

Oxyfilní granula, Locle. 181

Pal-Weigertova metoda 150

Panchrom, barvení 181

Pankreatin, zažívání 76

Pappenheim barvení 181

Pappenheim-Unna 141

Paraboloidový kondensor 35

Paraffin 98, ~ pásy 114, ~ celloidin
103

Parakarmin 135

Parker fixace meth. modře 173

Pepsin 76

Perenyova tekutina 62

Peroxydasy 184

Peterfi, cel. paraf. zalévání 104

Phloroglucin, odvápnění 71

Pikrová kyselina 64, 71, ~ filtr 208
Plankton sbírání 218, ~ konzervace
219

Podložní skélka 90

Pochod zalévání do celloidinu 98,
~ celloid.-paraffin 103, ~ zhoto-
vení trvalých preparátů 91

Polarizační přístroj 41

Polychromová modř 145

Preparační jehly 43

Pryskyřice, reakce a barvení 185

Přesné měření mikroskop. 40

Příprava barev 125, ~ pro injekci
187, ~ materiálu pro injekci 196,
~ pro řezání z paraffinu 112

Přičezávání paraffinu 113

Přístroje k injekci 193, ~ ke kres-
lení 36, ~ mikrofotogr. 205

Prostředky fixační 56

Purpurin 72

Pyrogallol dle Kossa 72

Rabl, lepení řezů 118, -ova teku-
tina 60

Ranvier, ammon. karmin 134, ~
alkohol 74, ~ dehtová barviva
123, ~ chlorid zlatnatý 170, ~
mikrotom 80, ~ pikrokarmín 75

Rathova tekutina 65

Ravitzova tekutina 64

Reichertův mikrotom 80

Rejsek, přímé barv. deht. barv. 137

Rekonstrukční metody 199

Revolver 24

Rhumblér, barvení 145

Ricci, barvení spiroch. pal. 215

Rosin, barvení centr. nervstva 152

Rubaschkin, celloid. serie 111

Rychlá metoda lepení řezů 119

Ředění lihu 220

Řezání z paraffinu 118, ~ z celloid.
105

Safranin 138, 173

Salmon, anthrapurpurin 72

Sartorius, mikrotom 88

Scarpatti, centr. nervstvo 157

Seller indigokarmín 144

Seriové řezy, z celloidinu 107, .
z paraffinu 118

Serum jodové 46, ~ umělé 45

Sferická vada 10, 27

Sikora, řezy malakofágů 216

Silsen ~ zalévání, acetón 102

Skélka podložní a krycí 14, 15, 90

Skleněné nádobky 44, ~ uhly k za-
lévání 100

Speciální barvení 146

Spirochaeta pallida 214

Stabilita 113

Stínítka 21

Stolek ke kreslení 38

Sublimát 60, ~ odstranění krystalů
61

Sudan III. barvení tuku 177

Svorky objektů 84

Schaffer, odvápnění 69, 73

Schällibaum, lepení 116

Schnitzler, barv. nervu 151

- Schriede, barvení 181
 Schussik, průkaz vápna 72
 Sternberg, barvení 180
 Stoelzner, průkaz železa v řezech 177
 Strasser, lepení řezů 116
 Ströbe, nervstvo 155
 Škrob, mikr. reakce a barvení 185
- Tänzer, elast. tkáň 173
 Tekutina, pozorování za čerstva 45,
 ~ Löwiho, ~ Perenyova, ~ Mülle-
 rova atd. viz dle jména
 Tellyesniczky 53, 56
 Tepelná skřiň mikroskop. 33
 Thermoregulator 101
 Thermostat 101
 Thionin 139
 Thoma, odvápnění 71
 Tmavé pole 35
 Tolluidinová modř 139, ~ Bethe,
 neurofibrilly 164
 Tonkoff, anil. modř. 143
 Triacid, Mayer 145, ~ Ehrlich 144
 Trichlor ~ octová kys. 66
 Trvalé preparáty 91, ~ v glyce-
 rinu 47
 Tríslovina, reakce mikrosk. 185
 Tuk barvení 177
- Úhel otevření, čočky 10, 27
 Ultrafialové světlo 209
 Ultramikroskop 34
 Umělé serum jodové 45, -á slina
 75
 Unna, barvení mucinu 176, vláken
 kollagen. 175, ~ bílení 77, elas-
 tická tkáň 174, ~ peroxydasy 184
 Upevnění nože 85
- Vady po zalití do celloidinu 106,
 ~ celloid. řezů seriových 110, ~
 při hotovení trvalých preparátů
 92, ~ při řezání z paraffinu 114,
 ~ seriových řezů paraff. 121
 Vápno, průkaz v řezech 72
 Vaselevský 54
- Verocay, formol. sraženiny 63
 Vesuvín 139
 Visutá kapka 52
 Vogel, řezy z pediculus vest. 217
 Völker, modifikace barvení V. Gic-
 sonem 142
 Výbrusy kosti zubů 77
 Vyšetřování blan 49, ~ za čerstva
 48, ~ krve za čerstva 51
 Vytápěcí stolek 33
- Wassermann, celoid. paraf. 104
 Weigenreich, fixace krve 178
 Weigert, barvení bakterií 212, ~
 barvení fibrinu 176, ~ celoid.
 serie 110, ~ elastin 174, ~ barvení
 nervstva 148, ~ barvení nervstva
 bez odbarvení 149, ~ neuroglia
 168, ~ haematoxylin 130
 Wiener, amoebý ve stolici 216
 Wolters, osový válec 152, 156
 Wolters-Kultschicky, haematoxylin
 131
- Xylol 46, ~ anilinový olej 46, ~
 karbol. kyselina 111
- Zalévání do celloidinu 95, ~ celoid.
 paraffin 103, ~ do paraffinu 98
 Zazívání 76
 Zeleně methylova 140
 Zenkerova tekutina 58
 Zetnoff, filtr světelný 208
 Ziehl-Nehlsen 213
 Zieler, granula 182
 Zimmermann, barv. dřevoviny 184
 Zorné pole 16
 Zrcadlový kondensor 35
 Zubní email, odvápnění 71
 Zvětšení v mikroskopu 16
 Zwaardemaker, safranin 138
- Železitý haematein Hensen 129
 Železo v řezech, průkaz 177
 Žlučovod. kapiláry, barvení 180



