MIKROSKOPET

OG

DEN MIKROSKOPISKE TEKNIK

EN VEILEDNING

FOR

LÆGER OG STUDERENDE

AF

F. G. GADE
PROSEKTOR I HISTOLOGI

KRISTIANIA
H. ASCHEHOUG & CO.s FORLAG
Hovedkommissionær for Danmark: H. Hagerup
1899

MIKROSKOPET

OG

DEN MIKROSKOPISKE TEKNIK

MIKROSKOPET

OG

DEN MIKROSKOPISKE TEKNIK

EN VEILEDNING

FOR

LÆGER OG STUDERENDE

AF

F. G. GADE
PROSEKTOR I HISTOLOGI

KRISTIANIA
H. ASCHEHOUG & CO.s FORLAG
1899

Aktie-Bogtrykkeriet

Indholdsfortegnelse.

FØRSTE AFSNIT

ANDET AFSNIT

TREDIE AFSNIT

FØRSTE AFSNIT.

OM MIKROSKOPET.

Benævnelsen mikroskop omfatter egentlig saavel det enkle som det sammensatte mikroskop.

Det enkle mikroskop bestaar blot af et optisk system, en enkel (akromatisk) linse eller lupe, baaret af et stativ.

Det sammensatte mikroskop er det, som i vore dage betegnes med mikroskopnavnet. Det bestaar af to samvirkende linser eller linsesystemer med dertil hørende stativ og belysningsapparat.

Det blev opfundet i 1590 af brillemageren Zacharias Jansen i Middelburg.

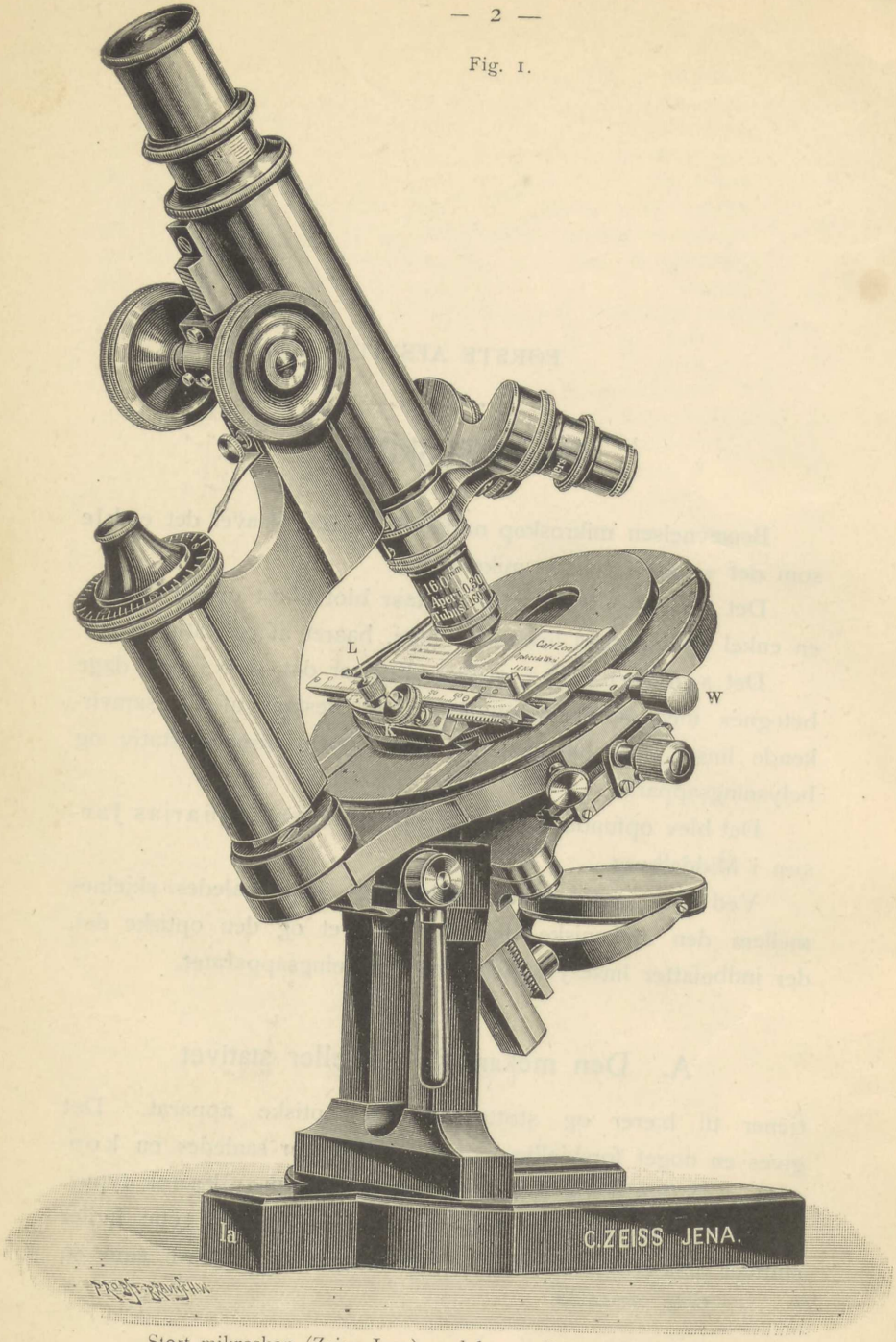
Ved det sammensatte mikroskop kan saaledes skjelnes mellem den mekaniske del eller stativet og den optiske del, der indbefatter linsesystemerne og belysningsapparatet.

A. Den mekaniske del eller stativet

tjener til bærer og støtte for det optiske apparat. Det gives en noget forskjellig bygning. Man har saaledes en kontinental (fransk og tysk) og en engelsk-amerikansk typus.

Ved den hos os mest anvendte kontinentale type hviler stativet paa en solid fod af metal, gjerne af form som en

Fig. 1.



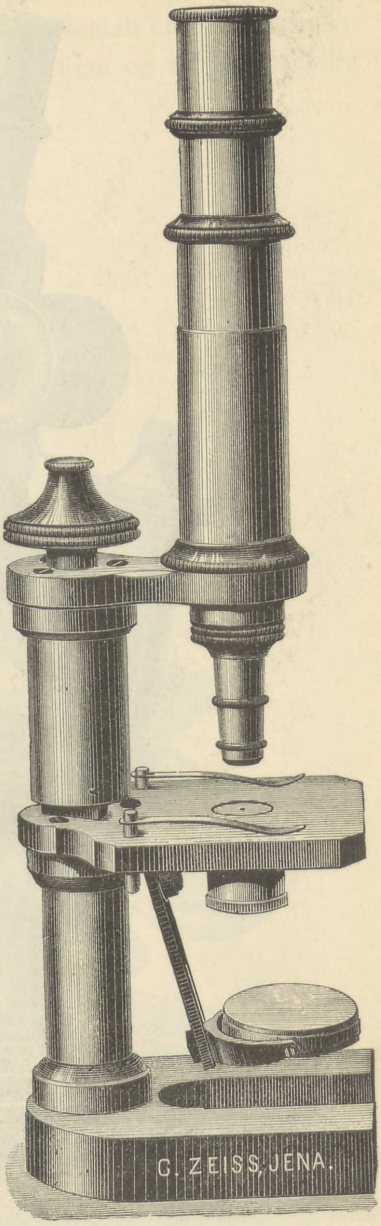
Stort mikroskop (Zeiss, Jena) med bevægeligt og dreibart bord.

hestesko (« hesteskomikroskop »). Fra foden hæver sig søilen, der bærer det horizontale bord, som kan gjøres enten rundt eller firkantet.

I midten af bordet er der en aabning til gjennemgang for lysstraalerne, der reflekteres op herigjennem af det under bordet anbragte belysningsspeil med eller uden et mere kombineret belysningsapparat af linser. Selve lysaabningens størrelse kan forandres ved at indsætte blændere, diaphragmer, af forskjellig aabning. Bordets øverste flade gjøres sort for at undgaa den generende lysreflex fra det blanke metal, og er gjerne belagt med glas eller koutschouk, til beskyttelse mod indvirkning af kemikalier. Paa bordet findes i regelen ogsaa etpar elastiske metalklemmer til at holde præparatet fast med.

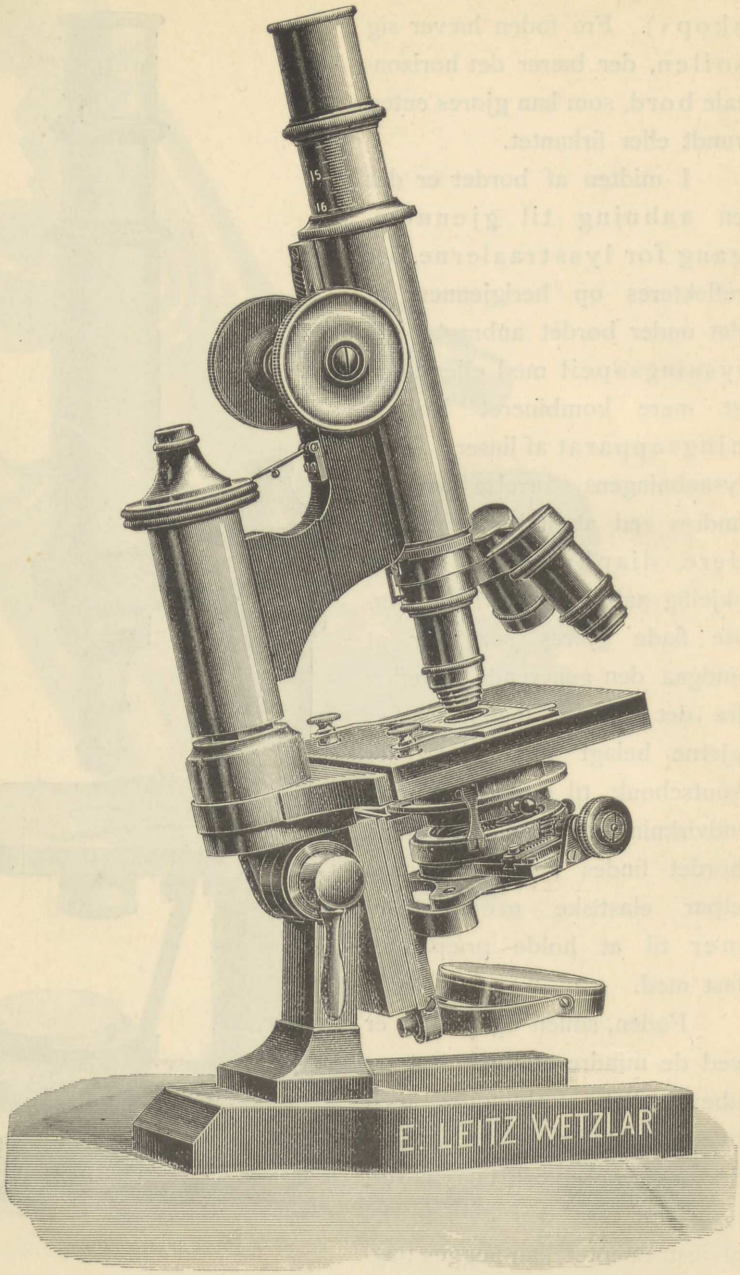
Foden, søilen og bordet er ved de mindre stativer fast og ubevægeligt forbundne med hverandre. Paa større stativer findes gjerne et charniereled i søilen, saa den øverste del af instrumentet kan lægges bag-

Fig. 2.



Lidet mikroskop.

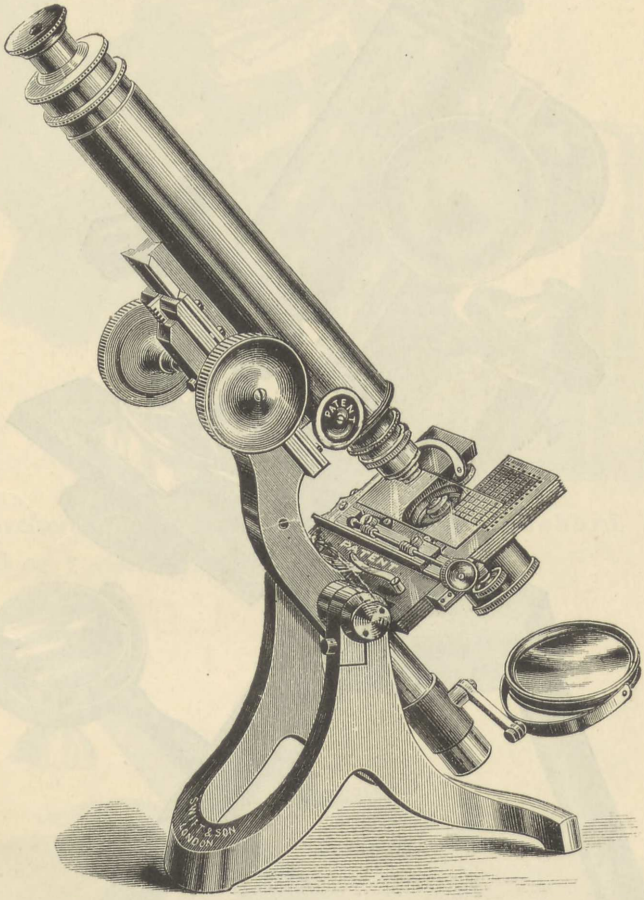
Fig. 3.



Middels mikroskop (Leitz, Wetzlar).

over til lettelse ved arbeidet. Ogsaa bordet gjøres ofte bevægeligt, saa det dels kan dreies horizontalt om sit midtpunkt, dels ved skruemekanismer kan føres frem og tilbage samt fra side til anden (se fig. 1, 4, 8 og 9).

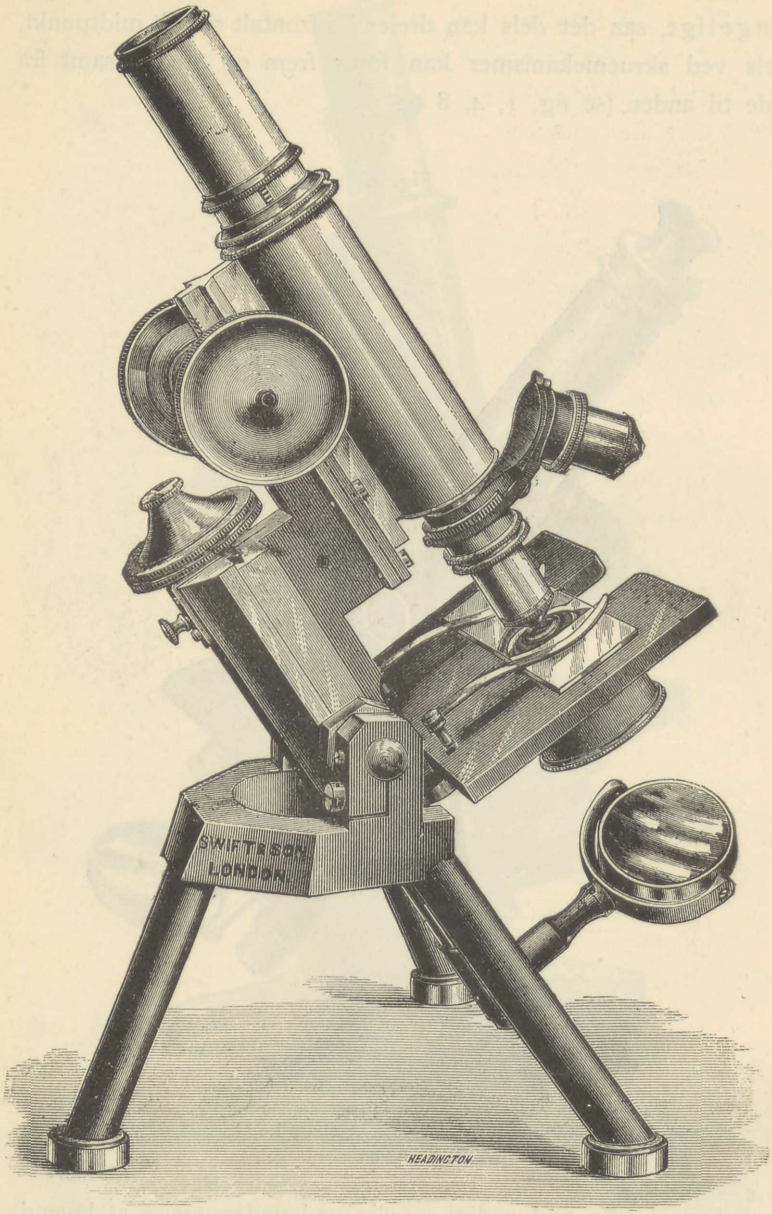
Fig. 4.



Engelsk model (Swift & Son, London).

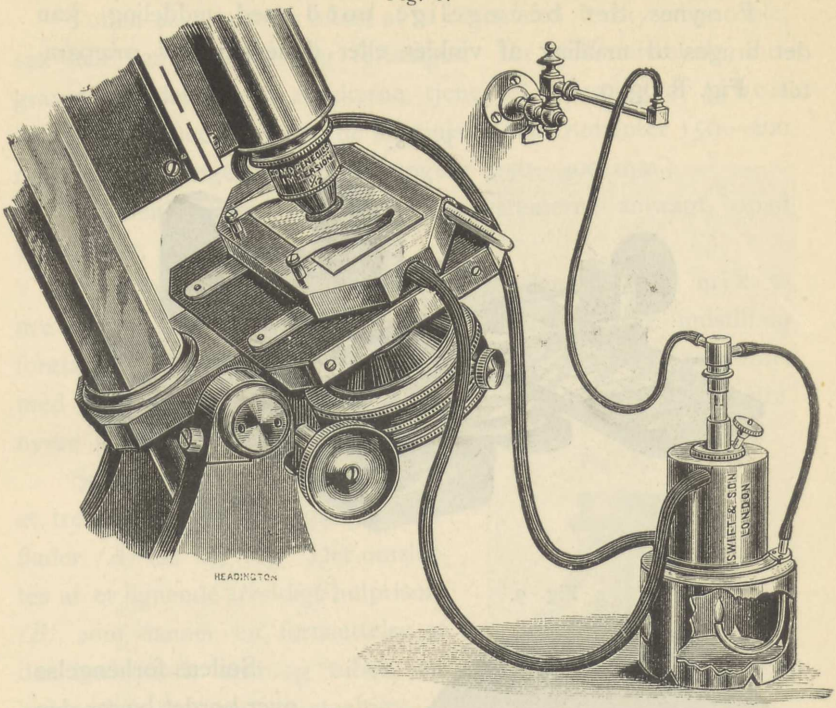
Det er ofte nødvendigt, særlig ved undersøgelse af levende organismer, at holde præparatet i en høiere temperatur end

Fig. 5.



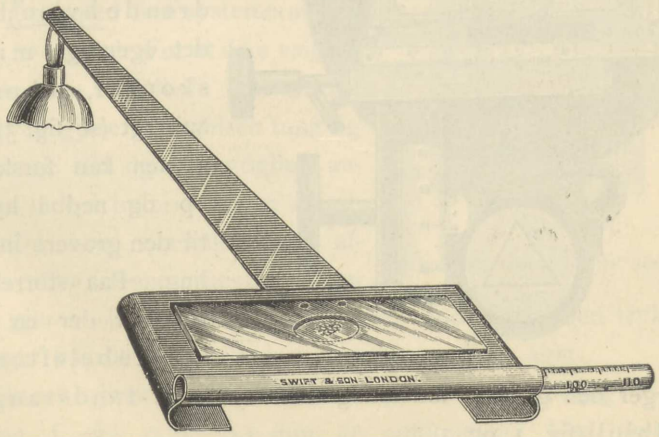
Engelsk model (Swift & Son, London).

Fig. 6.



omgivelserne. Den gjøres ved hjælp af varmebord, hvoraf fig. 6 og 7 viser forskjellige konstruktioner.

Fig. 7.



Forsynes det bevægelige bord med inddeling, kan det bruges til maaling af vinkler eller dimensioner i præparatet Fig. 8 og 9.

Fig. 8.

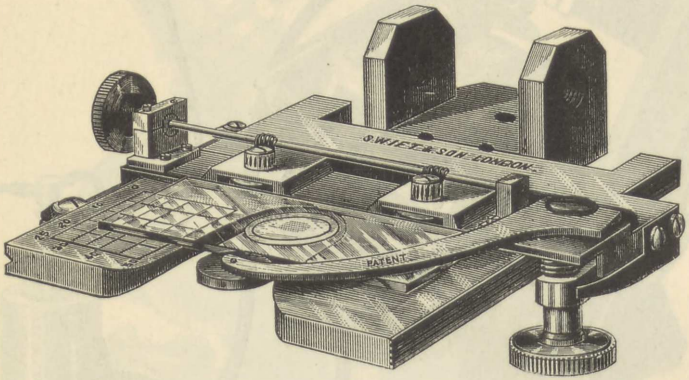
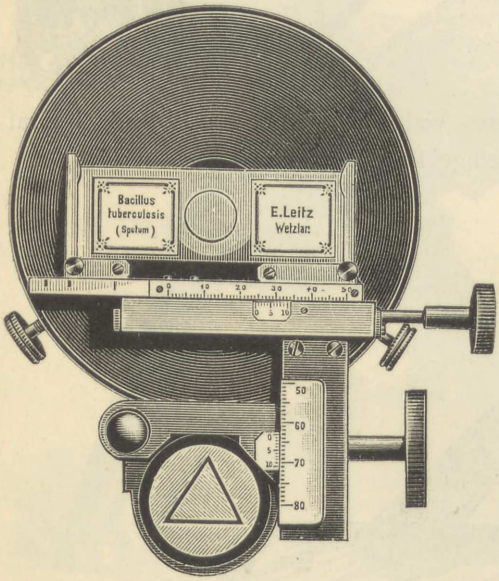


Fig. 9.



Søilens forlængelse over bordet bærer den horizontale arm. Paa mindre stativer ender denne i en fjedrende hylse,*) hvori det egentlige mikroskoprør, tuben, er anbragt (se fig. 3), saa at den kan forskyves op og ned i hylsen til den grovere indstilling. Paa større stativer er der en særegen tubeløfter, der besørger den grovere indstilling ved hjælp af tandstang og tandhjul (fig. 1 og 3).

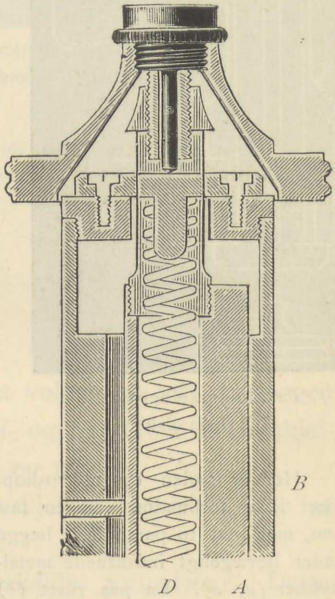
*) det hedder paa dansk et Hylster

Tuben selv bestaar oftest af to i hinanden forskyvelige dele, saa den kan forkortes og forlænges. En millimeterskala, indgravet paa det ene af stykkerne, tjener til aflæsning af tubuslængden. Denne er paa de kontinentale instrumenter 150—200 mm., paa de engelske meget længere (250—400 mm.).

I tubens begge ender er linsesystemerne anbragt, opad okularet, nedad objektivet.

I søilens forlængelser findes i regelen anbragt mikrometerskruen, hvorved mikroskopets fine optiske indstilling foretages. Dette er stativets vigtigste del, og maa være udført med en høi grad af nøiagtighed. Anordningen er ved Leitz' nyere instrument saaledes:

Fig. 10.



Mikrometerskrue (Leitz' system).

Søileforlængelsen gives form af et tresidigt prisme med glatpolerede flader *(A)* (se fig. 10). Det omsluttes af et lignende tresidigt hulprisme *(B)*, som danner en fortsættelse af den horizontale arm og tuben, og holdes her støt ved en staaltjær.

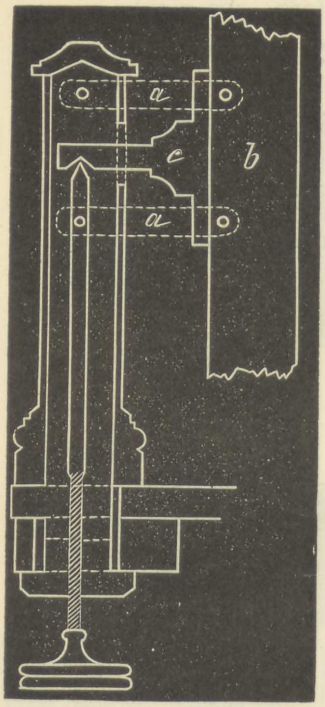
Ved hjælp af den meget nøiagtigt forarbeidede mikrometerskrue *(C)* kan det ydre hulprisme og derved tuben med linsesystemerne bevæges op og ned. For at ikke vægten af disse dele skal hvile paa skruen og derved gjøre bevægelsen tung og frembringe slid og unøiagtighed, anbringes inde i hulprismet en spiralfjær *(D)*, hvis spændkraft er afpasset efter denne vægt. Ligeledes gjøres skruen selv og de dele, mod hvilke den trykker, af meget haardt materiale som hærdet staal og agat.

Skruen gives nu om stunder gjerne en nøiagtig kjendt stigning, f. eks. 0,25—0,5 mm. pr. omdreining. Ved hjælp af

en inddeling paa skruehovedet (se fig. 1) kan indstillingsforandringer ned til 0,01 mm. og mindre direkte aflæses (dybdemaalinger).

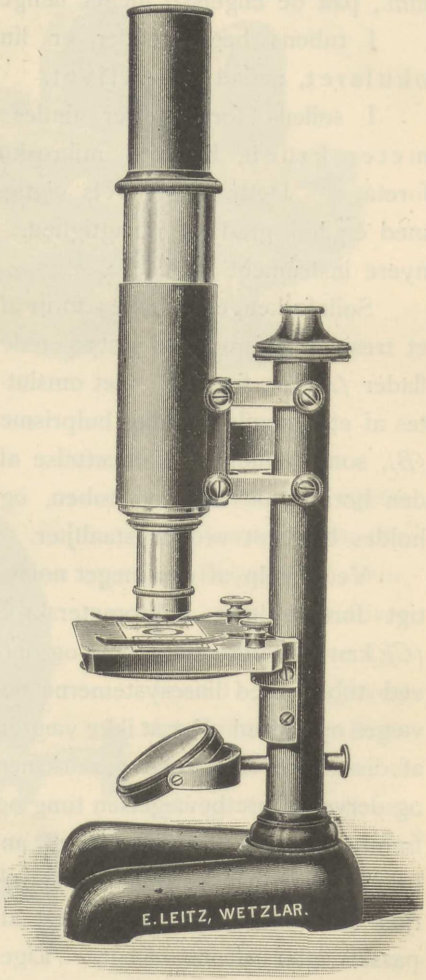
En anden om end mindre anvendt anordning af den fine indstilling har man i den saakaldte parallelogrambevægelse.

Fig. 11.



Parallelogrambevægelse (skematisk).

Fig. 12.



Lidet mikroskop, mikrometerskrue med parallelogrambevægelse.

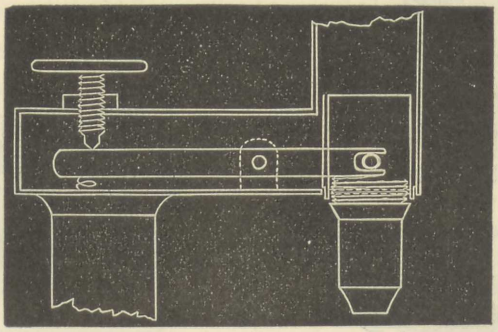
Her er søilen og mikroskoprøret ikke forbundne ved en fast arm, men ved to parallele, i begge ender bevægeligt indskruede metalstykker *(a, a)*. En paa røret *(b)* fast anbragt metalarm *(c)* hviler gjennem en split i søilen paa mikrometerskruens spids, og ved dennes bevægelser blir nu armen og dermed mikroskoprøret hævet og sænket.

Den theoretiske indvending mod parallelogrambevægelsen, at den ikke oregaar ret op og ned i den optiske akse, men er ledsaget af en side-

bevægelse, viser sig praktisk uden betydning, og denne mekanisme benyttes fremdeles af fremragende mikroskopfabriker og til de stærkeste forstørrelser.

Ved de engelske mikroskoper benyttes til den fine indstilling gjerne en vægtstangsbevægelse i forbindelse med skruer. Den hele mekanisme er anbragt i eller lige ved tuben og virker direkte paa selve objektivlinsen.

Fig. 13.



Mikrometerskrue med vægtstangsbevægelse.
Engelsk system. Skematisk.

Ved denne forening af skrue og uligearmet vægtstang kan der selvfølgelig opnaaes en meget jevn og langsom bevægelse og tilsvarende fin indstilling.

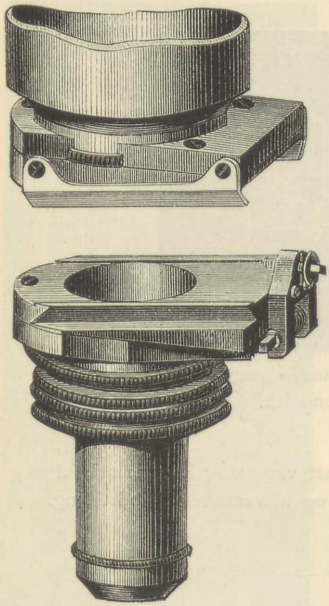
Under arbeidet med mikroskopet volder den ved skiftningen af forstørrelser nødvendige stadige af- og paaskruen af forskjellige objektivlinser adskillig tidsspilde og ulempe.

Man har derfor konstrueret forskjellige apparater for at lette linseombytningen.

Det mest anvendte er den saakaldte revolver. Dette apparat bestaar af en fast del, som indskrues i tuben, og en i forhold hertil om en akse bevægelig plade, hvori indskrues 2, 3 eller 4 linsesystemer. Idet pladen dreies om aksen, kan den ene eller den anden af linserne hurtig og let bringes foran tubens nederste aabning (se fig. 1, 3 og 5).

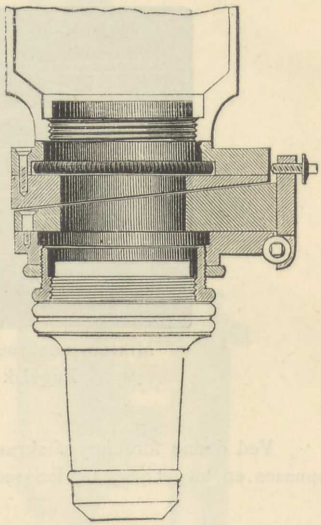
I samme hensigt har Zeiss, Jena, ogsaa konstrueret sin slædeobjektivveksler. Ogsaa den bestaar af 2 dele. Den ene af disse, tubusslæden, der skrues fast paa tuben, bærer

Fig. 14.



Slædeobjektivveksler (Zeiss).

Fig. 15.



Slædeobjektivveksler i stilling (Zeiss).

paa sin underflade et næsten horizontaltliggende skraaplan med falser paa siderne. Den anden del, objektivslæden, i hvilken objektivet indskrues, har paa oversiden en tilsvarende plan flade og passer ind i tuben og slædens falser. Idet nu alle objektiver er forsynet med hver sin objektivslæde, kan de med stor lethed ombyttes. Ved hjælp af smaa skruer kan den nøiagtige indstilling af objektiverne i mikroskopets optiske akse finde sted.

B. Den optiske del

af mikroskopet indbefatter a) linserne (linsesystemerne) og b) belysningsapparatet.

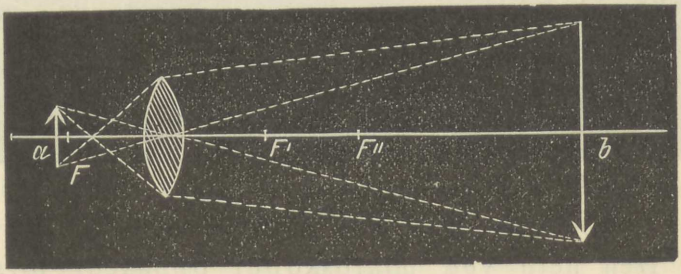
a. Linsesystemerne

er anbragte i tubens begge ender, objektivet nedad mod den undersøgte gjenstand, objektet, okularet opad mod iagttagerens øie.

For at forstaa det sammensatte mikroskops virkning, maa man erindre følgende sætninger af den elementære optik:

1) Af en lysende gjenstand *(a)*, der befinder sig foran en konvex linse og udenfor sammes brændvidde *(F)*, dannes, efter at straalerne har passeret linsen, paa dennes bagside et reelt, forstørret og omvendt billede *(b)* mellem den dobbelte fokalafstand *(F_2)* og uendeligheden.

Fig. 16.

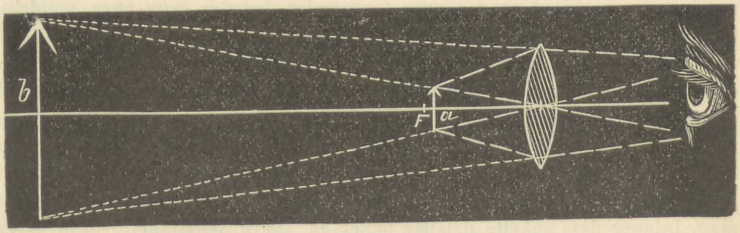


Objektivvirkning.

Dette er virkningen af objektivet

2) Af en lysende gjenstand *(a)*, der befinder sig foran en konvex linse indenfor dennes brændpunkt, fremkommer paa samme side af linsen et vir-

Fig. 17.



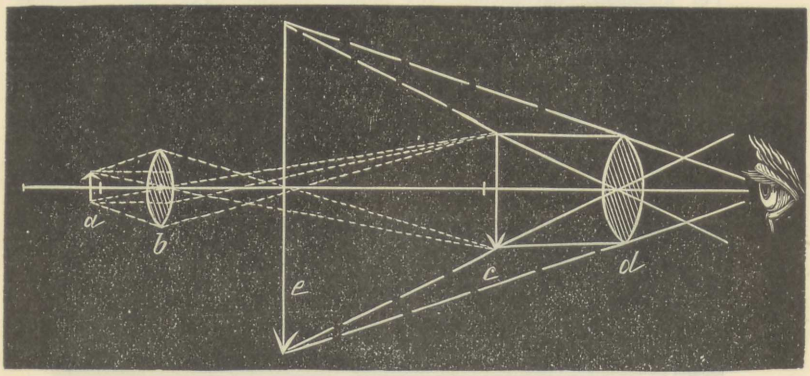
Virkningen af okularet, lupevirkning.

tuelt, forstørret og opretstaaende billede beliggende mellem den dobbelte fokalafstand og uendeligheden (lupevirkning).

Dette er virkningen af okularet.

Den samlede virkning af mikroskopet fremkommer ved, at det af en gjenstand, *a* (se fig. 18), gjennem objektivlinsen, *b*, dannede forstørrede, reelle billede, *c*, betragtes som med en lupe gjennem okularlinsen, *d*, hvorved der af *c* fremkommer et yderligere forstørret virtuelt billede, *e*.

Fig. 18.



Straalegangen i det sammensatte mikroskop. Samlet objektiv- og okularvirkning.

Den hele ved mikroskopet opnaaede forstørrelse er saaledes produktet af objektiv- og okularforstørrelsen.

Som maal for denne angives nu altid den lineære forstørrelse ɔ: forholdet mellem længden af en linie seet i mikroskopet og seet med blotte øine. I mikroskopiens barndom regnede man ogsaa efter kvadratisk forstørrelse, hvorved man kunde komme op i imponerende tal. Naar det saaledes berettes om instrumenter med 1000 ganges forstørrelse, betyder dette efter nutidens betegnelsesmaade kun en forstørrelse paa neppe 31,7 gange.

Det er dog ikke ligegyldigt, hvilken af de to faktorer, objektivet eller okularet, der tildeles den væsentligste rolle ved frembringelsen af forstørrelsen.

Det er nemlig udelukkende objektivet, som optager straalerne fra gjenstanden og deraf danner det forstørrede reelle billede. Kun hvad deri findes, blir gjenstand for den yderligere forstørrelse ved okularet, dette selv kan intet nyt bringe ind. Det giver kun objektivets reelle billede en større fladeudbredning, bringer dets enkelte detaljer under en større synsvinkel. Kun saalænge objektivbilledet endnu indeholder detaljer, der paa grund af sin lidenhed ikke

kan opfattes af øiet, er en forøgelse af okularforstørrelsen hensigtsmæssig. Naar alle objektivdetaljer træder frem for øiet, betyder en yderligere okularforstørrelse blot en unyttig tøining af billedet. Den er unyttig og for saa vidt endog skadelig, som den ved at fordele den samme lysmængde over en større flade gjør billedet lyssvagere og desuden forstørrer alle feil ved billeddannelsen, som ved en ringere okularforstørrelse kan oversees.

Kun ved de stærkeste og mest fuldkomne objektiver kan det derfor være berettiget at bruge stærke okularer.

Ved en smule erfaring vil man ogsaa snart lære at aflægge den sædvanlige begynderfeil at overdrive okularforstørrelsen.

Den væsentlige del af forstørrelsen bør derfor søges opnaaet gjennem objektivet.

I. Objektivet.

Forstørrelsen.

Fysiken lærer, at linsernes forstørrende evne øges, jo kortere brændvidde de har, jo stærkere deres overfladekrumning er.

Forsøget paa at tilveiebringe stærke forstørrelser ved anvendelsen af enkle linser med mindre og mindre krumningsradier støder dog paa store hindringer, dels af teknisk natur, idet saadanne smaa linser er meget vanskelige at fabrikere nøiagtigt, dels af optisk natur, nemlig den med stigende krumning ogsaa stadig øgende sfæriske og kromatiske aberration, og den derpaa beroende indskrænkning i linsens brugbare synsfelt.

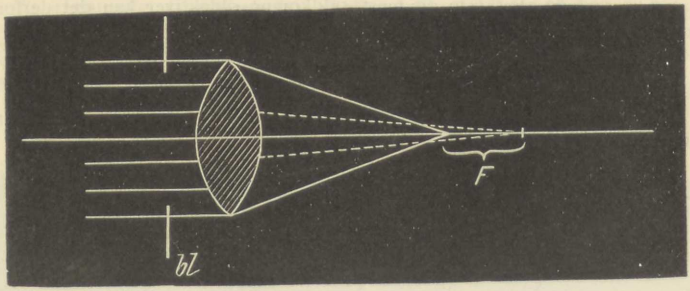
Den sfæriske aberration er en følge af, at linser med kugleflader bryder lysstraalerne stærkere i randpartierne end i midtpartierne.

De gjennem sfæriske linser brudte straaler samles altsaa ikke «homocentrisk» i et enkelt brændpunkt F, men i en brændlinie F_1, midtstraalerne længst borte fra linsen, randstraalerne nærmere og nærmere. (Fig 19).

Det dannede billede vil derfor faa en uensartet forstørrelse, vil vise sig fortrukket, idet den ved midtstraalerne bevirkede

forstørrelse er mindre end randstraalernes. Et kvadratisk net vil, seet igjennem en saadan linse, ikke vise lige store masker over hele synsfeltet, men større og større udover mod randene.

Fig. 19.



Virkningen af den sfæriske aberration og dens korrektion ved afblænding af randstraalerne.

Det vil dernæst ogsaa være forvisket, især ud mod randene, idet de af randstraaler og midtstraaler dannede billeder ikke falder i samme afstand fra linsen, men ligger over hverandre og saaledes falder ind i hverandres spredningskredse.

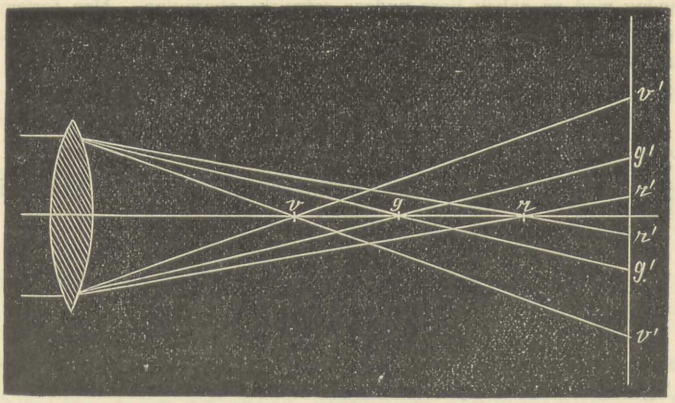
Disse ulemper tiltager i stærkt stigende grad med linsens krumning og udad mod randene. I linsens midtparti og ved svagere krumninger gjør de sig forholdsvis lidet gjældende.

Den kromatiske aberration er en følge af de prismatiske farvers forskjellige brydbarhed (fig. 20).

De violette straaler brydes stærkest *(v)*, forenes nærmest linsen, de røde svagest, forenes længst fra linsen *(r)*.

Herved opstaar ligeledes i stedet for et brændpunkt en (kromatisk) brændlinie *(v—r)*. Langs denne befinder sig en række billeder af forskjellig farve svarende til prismefarvernes forskjellige brydbarhed, liggende i hverandres spredningskredse. Nærmest den optiske akse, hvor alle straaler blandes, vil der dannes et ufarvet billede, men da spredningskredsene tiltager med vedkommende farves brydbarhed, vil der udad mod periferien dannes farvede ringe, og billedets yderrest kan blive violet, dannet af den stærkest brydbare farve. Denne forskjel i det af de enkelte farver dannede billede kaldes den kromatiske forstørrelsesdifferens.

Fig. 20.



Den kromatiske aberration bevirker, at det mikroskopiske billede forstyrres af farvede konturer.

Den er af væsentlig betydning for en linses brugbarhed og af langt større vigtighed end den sfæriske aberration. Ved stærkt spredende glassorter (f. eks. flintglas) kan den kromatiske brændlinie gaa op til $^1/_{20}$ af brændvidden.

Saavel den sfæriske som den kromatiske aberration bevirker saaledes en med linsernes krumning stadig stigende uklarhed i billedet og danner derved tilslut hindring for anvendelsen af linser med meget korte krumningsradier.

Ulemperne ved disse aberrationer kan imidlertid til en ikke ringe grad afhjælpes.

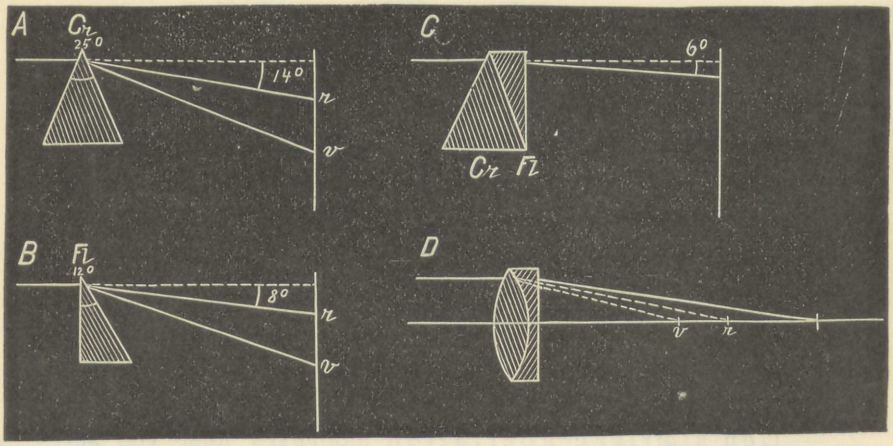
Den sfæriske aberration modvirkes først ved anvendelsen af blændere, der udelukker randstraalerne (fig. 19 *bl*), saa at kun de praktisk talt homocentriske midtstraaler deltager i billeddannelsen. Dog aftager herved billedets lysstyrke paa grund af udelukkelsen af en del af straalerne. Ligeledes er den sfæriske aberration mindre udtalt ved plan-konvexe linser med den plane side vendt mod objektet. Paa en mere fuldkommen maade ophæves virkningerne af den sfæriske aberration ved kombination af to eller flere linser med modsat sfærisk aberration, der gjensidig nøitraliserer hverandre.

Ved anvendelse af glas med elliptiske og paraboliske flader kan man vistnok endog med en enkelt linse undgaa «sfærisk» aberration. Men forfærdigelsen af saaledes slebne glas støder paa saa store praktiske vanskeligheder, at det ikke lønner sig.

Den kromatiske aberration afhjælpes for en væsentlig del ved anvendelse af de saakaldte akromatiske linser. Disse bestaar af parvis sammensatte linser af forskjellig spredningsevne, i regelen af crownglas og flintglas.

Den kromatiske aberration vilde være uafhjælpelig, dersom lysets brydning og spredning i de enkelte medier (glassorter) stod i samme indbyrdes forhold. Dette er dog ikke tilfældet. Saaledes har flintglas (kali-bly-silikat) omtrent dobbelt saa stor spredningsevne som crownglas (kali-kalk-silikat), medens dets brydningsevne kun er ubetydeligt større.

Fig 21.



A kromatisk spredning ved kronglasprisme 25°.
B do. do. » flintglasprisme 12°.
C straalegangen i et akromatisk prismepar.
D do. » do. linsepar.

I et kronglasprisme paa 25° og et flintglasprisme paa 12° er farvespredningen saaledes den samme, medens kronglasprismet afbøier lyset ca. 14° og flintglasset kun ca. 8° (fig. 21 *A* og *B*).

Sættes nu to saadanne prismer sammen med de brydende vinkler i modsat retning af hverandre (se fig. 21 *C*), vil det af kronglasset spredte lys atter samles af det lige stærke, men i modsat retning virkende flintglasprisme og træde ud af dette som tilnærmelsesvis hvidt lys, og i en vinkel af 6° med den oprindelige straaleretning, netop forskjellen mellem de to prismers brydningsvinkel.

Dette forhold anvendes til korrektion af linsers kromatiske aberration, idet en (*bi-*)konvex kronglaslinse forbindes med en (plan-)konkav flintglaslinse af saadan krumning, at den formaar at ophæve den førstes spredning. Linserne sammenkittes ved hjælp af kanadabalsam.

Et saadant linsepar siges at være akromatisk ɔ: ufarvet (α privativ og chromos = farve). (Se fig. 21 *D*).

Man taber ved disse visselig en del af linsens forstørrende evne, men faar fuldstændigt vederlag herfor i den ved den kromatiske korrektion opnaaede større skarphed i billedet.

Linser, hvori baade den sfæriske og kromatiske aberration er ophævede, kaldes aplanatiske. Dog bruges dette udtryk ogsaa stundom særlig om de for sfærisk aberration befriede linser.

Alle for tiden anvendte objektiver sammensættes af saadanne akromatiske og aplanatiske linser.

Imidlertid giver heller ikke disse akromatiske linser et fuldkommen rent, farvefrit billede. En liden farverest bliver nemlig tilbage ukorrigeret. Dette har sin grund deri, at de enkelte farver ikke brydes lige stærkt i flint- og crownglas. Opfanget paa en skjærm vil to lige lange spektra af kron- og flintglas derfor vise en forskjellig fordeling af farverne; de af de enkelte farver optagne rum vil ikke være lige store i begge spektra, og følgelig vil de omvendte spektra ikke fuldkommen nøitralisere hverandre. Der blir altid en farverest tilbage: det sekundære spektrum. Man maa derfor ved disse akromatiske linser indskrænke sig til at nøitralisere to farver ad gangen, og eftersom billedet indeholder en rest af røde eller af violette straaler, taler man om over- eller underkorrektion af linseparret.

I den senere tid har det imidlertid lykkedes i det glastekniske laboratorium i Jena (under ledelse af Schott, Zeiss og Abbe) at fremstille glassorter (borsyre- og fosforsyreglas) med ensartet spredning (dispersion). Ved at anvende disse opnaaede Zeiss at konstruere et objektivsystem, hvori to par farver er nøitraliserede, saa at ogsaa det sekundære spektrum er fjernet. Den ubetydelige farverest, som endnu er tilbage (det tertiære spektrum), er uden praktisk betydning.

Man har kaldt disse linsekombinationer, der besidder en «akromasi af høiere orden», for apokromatiske. De tillader benyttelsen af randstraalerne og gir særdeles rene og lysstærke billeder paa grund af saa godt som alle straalers homocentriske forening. De anvendes til finere undersøgelser.

Den kromatiske forstørrelsesdifferens (se side 16) kan vistnok heller ikke ved apokromatiske linser fjernes. Men den blir ved disse lige stor, baade i midten og randen af linsen, og kan derfor kompenseres ved særegne, med den modsatte feil konstruerede okularer, kompensationsokularer. Da imidlertid den kromatiske forstørrelsesdifferens ikke gjør sig gjældende ved de svagere linser, maa disse, for at kunne benyttes med kompensationsokularer, med vilje gives en bestemt kromatisk forstørrelsesdifferens, hvorfor de paa sin side igjen ikke kan anvendes ved de almindelige svagere akromatiske objektiver.

Leitz, Wetzlar, konstruerede i sin tid en række meget smukt farvekompenserende systemer, som benævnes pantakromater.

Swift & Son i London har nylig ligeledes konstrueret en række objektiver med en meget betydelig akromasi, om end ikke saa absolut som i apokromaten. Disse linser kaldes panaplanatiske.

Linsesystemer.

Saavel den sfæriske som den kromatiske aberration danner saaledes en følelig begrænsning for anvendelsen af stærkt krummede ɔ: forstørrende enkeltlinser.

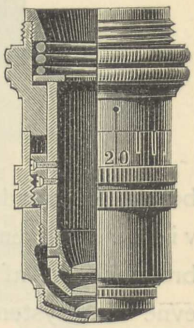
For dog at opnaa de nødvendige forstørrelser havde man allerede tidlig begyndt at anvende den samlede virkning af flere linser med svagere overfladekrumning. Man skruede blot flere saadanne sammen efter behovet.

Imidlertid var denne maade at addere linserne sammen paa beheftet med mange ufuldkommenheder; det var saaledes meget vanskeligt saavel at faa de sammenskruede linsers optiske akser til at falde sammen som at holde den rigtige afstand dem imellem.

Det var derfor et betydeligt fremskridt, da de faste linsesystemer indførtes af Selligue og Chevalier i 1824.

Disse systemer, som nu udelukkende benyttes, bestaar af et en gang for alle fast sammenskruet sæt linser, hvis brydningsevne, krumningsradier, indbyrdes afstand og øvrige bestemmende momenter er saaledes valgte, at de enkelte linsers aberrationer indbyrdes ophæver hverandre, saa det hele system derved er fuldt kompenseret.

Fig. 22.

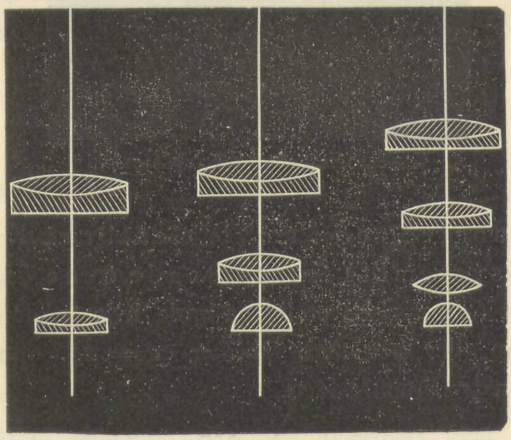


De stærkere systemer sammensættes ofte af op til 6—8 enkelte linser. Den mod objektet vendende linse, hvis ydre flade i regelen er plan, kaldes frontlinsen.

Linsesystemernes betegnelse er oftest rent vilkaarlig valgt af vedkommende fabrikant. De benævnes system 1, 2, 3, 4 osv. eller A, B, C osv., hvoraf der altsaa ikke kan sluttes noget med hensyn til deres forstørrende evne.

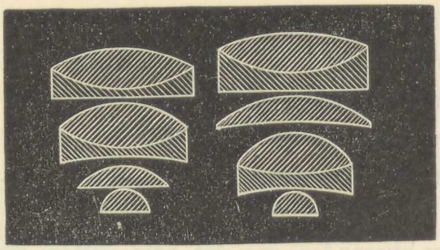
I den senere tid har man dog ogsaa paa fastlandet begyndt at anvende den i England længe benyttede, fuldt rationelle

Fig. 23.



2-leddet 3-leddet 4-leddet
linsesystem (skematisk).

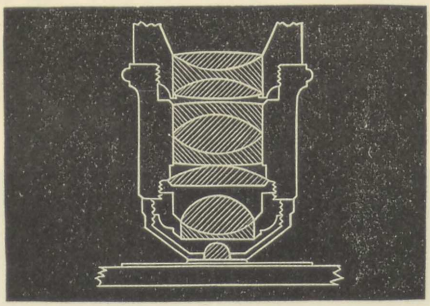
Fig. 24.



Typer for homogene immersionslinser.
(Efter Czapski).

betegnelsesmaade af systemerne efter æqvivalent-brændvidde (englændernes *nominal focus*) ɔ: med angivelse af brændvidden af den enkeltlinse, der har samme forstørrende evne som systemet. Man benævner saaledes 1 inch, $^1/_2$, $^1/_8$, $^1/_{12}$ inch, 25, 18, 12, 7, 4,3 mm. osv.

Fig. 25.



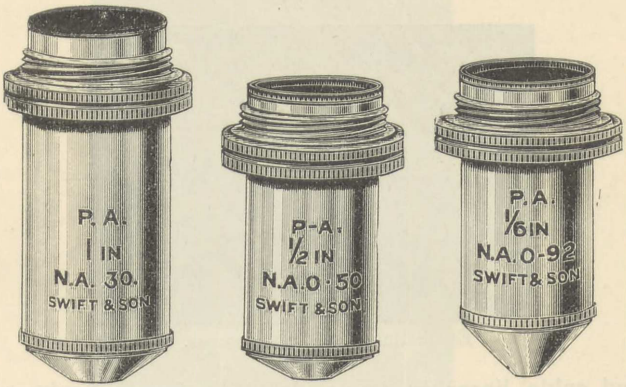
Apokromatlinse. (Efter Czapski).

Med angivelse af æqvivalentbrændvidden er objektivsystemets forstørrende evne direkte angivet, idet forstørrelsen er lig en brøk, hvis tæller er billedafstanden (der hos flere fabriker er = 250 mm.), og hvis nævner er æqv. brændvidden.

$$F = \frac{250}{\text{æqv. br.}}$$

(Zeiss' system A med æqv. brv. 18 mm. har saaledes en egenforstørrelse af ca. 14 gange, system D med æqv. brv. 4.3 mm. en forstørrelse af ca. 60 gange).

Fig. 26.



Æqvivalentbrændvidden falder dog ikke sammen med systemets virkelige brændvidde, heller ikke med frontlinsens afstand fra undersøgelsesobjektet. Denne frontaldistans, fri objektafstand eller arbeidsafstand er selvfølgelig af stor betydning under det praktiske arbeide med mikroskopet, da en stor afstand mellem frontlinsen og dækglasset altid medfører en bekvemmere og sikrere haandtering af undersøgelsesgjenstandene.

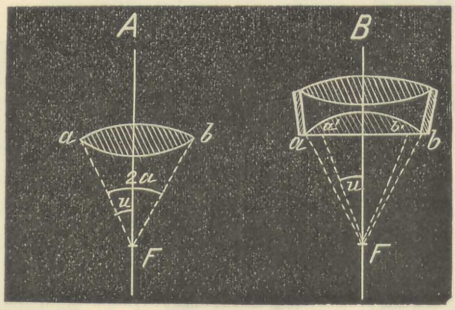
Aabningsvinkel og numerisk apertur.

Med forstørrelsen er en af linsesystemets vigtigste egenskaber angivet; men forstørrelsen alene giver intet udtømmende udtryk for linsens optiske evne.

Selv under forudsætning af fuldstændig sfærisk og kromatisk korrektion kan to systemer med samme forstørrelse (æqvivalentbrændvidde) besidde en meget forskjellig evne til at afbilde gjenstanden i dens enkeltheder.

Denne evne er nemlig afhængig af systemets aabning eller aabningsvinkel. Herved forstaaes vinkelstørrelsen af den fra et objektpunkt udgaaende straalekegle, som efter at have passeret objektivet deltager i billeddannelsen.

Fig. 27.



Enkle linser. Sammens. linsesyst.

Ved enkle linser er denne vinkel ligefrem udtrykt ved linsens diameter og fokalafstand ($a \,.\, F \,.\, b = 2\,u$), ved sammensatte linsesystemer paavirkes den selvfølgelig af linsernes indfatning, blændere og systemets hele konstruktion.

Denne vinkel, $2\,u$, kan være forskjellig ved systemer med samme forstørrelse; men jo større den er, jo flere lysstraaler der fra et og samme objektpunkt medvirker til dannelsen af det mikroskopiske billede, desto lyskraftigere bliver dette, og desto flere enkeltheder i objektet kommer til afbildning.

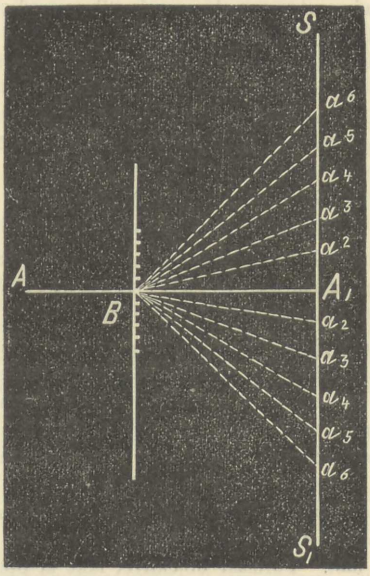
Denne et systems evne til at opløse et objekt i dets enkeltheder betegnes som systemets resolverende, opløsende, evne eller resolution. Denne er efter det ovenstaaende afhængig af aabningsvinkelen og stiger med samme; derfor giver man de specielt til meget fine detaljundersøgelser bestemte linser den størst mulige aabningsvinkel.

Betydningen af aabningsvinkelen fremgaar tydeligst i lys af Abbes theori for billeddannelsen i mikroskopet:

Den gjængse forklaring af billeddannelsen i mikroskopet gaar ud fra den forudsætning, at gjenstanden er en i objektfladen udbredt samling selvlysende punkter, der udsender retliniede straaler, som ved objektivlinsen atter samles til et billede (se pag. 13).

Men efter Abbe foregaar billeddannelsen i mikroskopet ikke saaledes. Objektet er ikke selvlysende, men en med gjennemfaldende straaler belyst gjenstand, og billedet dannes af de ved gjennemgangen sekundært forandrede lysstraalers forening.

Fig. 28.



Lysets diffraktion gjennem en spalte.

Disse sekundære forandringer henhører til diffraktions- eller afbøiningsfænomenerne.

Ved bøining eller diffraktion forstaaes som bekjendt den afvigelse fra det retliniede forløb, som en lysstraale undergaar, naar den passerer en meget liden aabning eller støder paa et meget lidet ugjennemsigtigt legeme. Passerer en lysbundt A (se fig. 28) gjennem en meget fin aabning eller spræk B, vil den forlade denne i form af en kegle med toppunkt i aabningen. En del af lysbundten fortsættes ret frem som «hovedbundt» A_1; den øvrige del af lysbundten vil sprede sig ud til siderne med aftagende styrke, a_2—a_6 (Frauenhofers bøiningsfænomen).

Opfanget paa en skjærm ($S S_1$) vil hovedbundten vise sig som en central, stimmelig lysstærk flæk, det absolute maximum (A_1). Udenfor dette koncentriske ringe af aftagende lysstyrke, sekundære maxima (a_2, a_3 osv.), adskilte ved mørkere mellempartier. Disse sekundære maxima viser desuden farvede rande, idet ikke alle spektralfarver bøies mest. Modsat forholdet ved den prismatiske spredning, bøies de røde straaler her stærkest, saaledes at de danner den ydre rand af lyskredsene, svagest de violette, der begrænser lyskredsene indad.

Lysstraalernes afbøining (afbøiningskeglens vinkeludbredning) bliver saa meget større, jo mindre de afbøiende elementers udstrækning og indbyrdes afstand

(spaltbredden) er. Den er ligeledes afhængig af bølgelængden af det anvendte lys: kortere bølgelængde — mindre afbøining. Er de afbøiende elementers afstand (spaltbredden) mange gange saa stor som bølgelængden, da er alle nogenlunde lysstærke bundter samlede i en spids kegle, men er spaltbredden liden, ɔ: kun nogle faa gange større eller endog mindre end lysbølgelængden, da kan afbøiede lysbundter af mærkbar styrke spredes til op mod 90° fra hovedbundten, altsaa over den ganske halvkugle.

Saadanne afbøiede, altsaa divergerende straaler kan som andre divergensstraaler ved en linse samles til et reelt billedpunkt.

Bestaar nu objektet af flere regelmæssig fordelte fine spalter og ugjennemsigtige mellemrum, vil der ved lysgjennemgangen opstaa ligeledes regelmæssig fordelte diffraktionsspektra.

Straalerne fra disse vil efter passagen gjennem linsen mødes og fremkalde interferensfænomener. Det er disse, som man saaledes egentlig ser i mikroskopet.

Denne «sekundære afbildning» beror altsaa paa de interferensfænomener, som et objektiv fremkalder ved foreningen af de ved objektet dannede afbøiningsspektra.

Afstanden mellem disse bøiningsspektra stiger som omtalt i samme forhold som de bøiende strukturelementer nærmer sig hinanden; jo finere struktur, desto større afstand mellem disse spektra. Anordningen af enkeltspektrerne svarer til strukturelementernes anordning; ligger disse i rette linier, vil ogsaa bøiningsspektrerne være retliniet anordnet osv., er strukturelementerne krydsede, vil ogsaa spektrerne optræde i krydsede rækker.

Skal det mikroskopiske billede være objektet fuldstændig ligt, maa hele bøiningsspektret kunne optages af objektivet, saa intet afbøiet lys af mærkbar styrke gaar tabt. Formaar objektivet ikke at optage alle de afbøiede straaler, men kun en del, vil mikroskopet vise billedet af en anden struktur, nemlig den, der vilde give et bøiningsspektrum netop saa stort, som den af objektivet optagne del. Jo mere der gaar tabt af det hele bøiningsspektrum, desto uligere blir billedet det virkelige objekt. For at en strukturdel overhovedet skal kunne sees, maa mindst to af dens bøiningsspektra kunne samtidig optages gjennem objektivets aabning.

Følgelig vil forskjellige objekter, der afgiver overensstemmende bøiningsspektra til objektivet, faa lige billeder; og lige strukturer, hvoraf ulige bøiningsspektra tilgodegjøres i objektivet, vil give ulige billeder. Mikroskopet kan for saa vidt foraarsage fuldstændig synkværving.

Hvor stor del af bøiespektret, der kan tilgodegjøres, er nu afhængigt af aabningsvinkelens størrelse.

Er denne stor nok til at optage det hele bøiningsspektrum, vil billedet blive fuldkommen ligt objektet,

jo mindre aabningsvinkelen blir i forhold til afbøiningsvinkelen, desto større ulighed mellem billede og objekt,

og er spredningen saa betydelig eller aabningsvinkelen saa liden, at ikke engang 2 bøiningsspektra trænger ind i objektivet, vil vedkommende strukturelement overhovedet ikke kunne afbildes.

Da det er de mindst og mest tætliggende strukturelementer, der foraarsager den betydeligste afbøining, sees det heraf ligetil, at jo finere struktur-

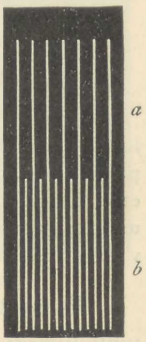
elementer, der skal afbildes, desto større objektivaabning udkræves der.

Herved kan forstaaes, hvorledes de ældre mikroskoper, hvis apertur var mindre end nutidens, kunde gjengive fine gjenstande, f. eks. diatomeernes struktur paa en saadan maade, at de nu ved samme forstørrelse, men med større apertur maa erkjendes for at være aldeles feilagtige.

Experimentelt kan disse forhold paavises ved hjælp af Abbes diffraktionsplade. Denne bestaar af et paa et vanligt objektglas monteret dækglas, forsølvet paa undersiden og med heri indridsede fine gittere og korsgittere med linieafstand paa dels 0,0075 dels 0,015 mm.

Fig. 29 viser et af «gitterne» paa Abbes diffraktionsplade, hvor stregerne paa den ene del *(a)* staar kun halvt saa tæt som paa den anden *(b)*.

Fig. 29.

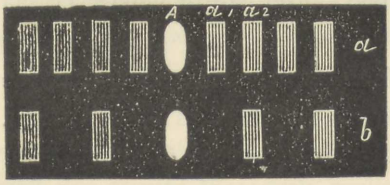


Som lyskilde anvendes en smal petroleumsflamme.

Man indstiller mikroskopet med et svagt objektiv paa liniegruppe *a*, saa begge gitterrækker er fuldt synlige, fjerner saa okularet og lægger øiet til tubens øverste aabning, hvor objektivets luftbillede findes. Man ser da i midten et klart billede af flammen (det absolute maximum, hovedbundten) og desuden ud til siderne to parallele rækker afbøiningsspektra (sekundære maxima), hvoraf de, der frembringes af det tætteste gitter *(b)*, staar nøiagtig dobbelt saa langt fra hverandre som de andre *(a)*.

Indlægges lige over objektivets øverste linse blændere med mindre og mindre aabning, forsvinder efterhaanden de sekundære spektra fra periferien indover, indtil f. eks. ved en af de trangere blændere de to sidste af det tætteste gitter dannede spektra blir borte, medens der af det grovere gitters spektra endnu er to tilbage. Indsættes nu paany okularet, vil man finde, at billedet af det underliggende dobbelte gitter er forandret. De øverste linier (med 0,015 mm. afstand) sees vistnok endnu tydeligt, men den nederste tætteste linierad er bleven fuldstændig usynlig: Der dannes af den intet billede, da aabningsvinkelen ved den indlagte blænder er bleven for liden til at optage endog blot to diffraktionsspektra deraf (kfr. fig. 31).

Fig. 30.

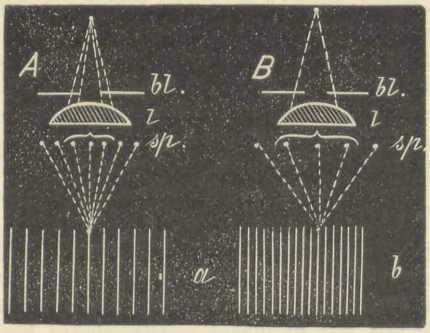


De samme forhold kan ogsaa forfølges for krydsende liniesystemer: de linier blir borte, af hvilke der i objektivets aabning ikke kan indtræde mindst 2 bøiningsspektra.

Om end et objektivsystems aabningsvinkel og forstørrelsesevne ikke staar i noget direkte forhold til hverandre, er de dog praktisk talt sammenhørende. En stærk forstørrelse er efter ovenstaaende unyttig uden en tilsvarende stor opløsningsevne, og en stor opløsningsevne kan kun tilgodegjøres, hvor objektivets forstørrende evne er tilstrækkelig til at fremvise det detaljerede billede under en tilbørlig stor synsvinkel.

De naturlige objekter, som staar disse kunstige diffraktionsplader nærmest, er diatomeskallerne, med deres regelmæssige liniesystemer. Den korrekte op-

Fig. 31.



løsning af stadig finere og finere diatomeer er derfor ofte brugt som praktisk prøve paa et objektivs aabning, og man kan her iagttage, hvorledes flader af et diatomeskal, der ved en linse ser jevn ud og saa godt som uden tegninger, under en anden linse med samme forstørrelse, men med større aabning tydelig viser sit fine linienet.

Et systems aabning betegnes ligefrem ved dens geometriske vinkelværdi, man taler om en aabning paa 12°, 20°, 60° osv.

Kun ved meget smaa aabningsvinkler er dog objektivets optiske evne nogenlunde proportional med vinkelstørrelsen og kan bedømmes direkte efter denne. Ved større vinkler er saa ikke tilfældet.

Abbe har fortjenesten af at have paavist, at ogsaa de lysbrydende medier foran linsen maa tages med i betragtning, ligesom han har formet det fuldgyldige udtryk for aabningens optiske værdi (se nedenfor).

Betydningen af de foran linsen liggende brydende medier sees ved at gaa ud fra følgende ræsonnement:

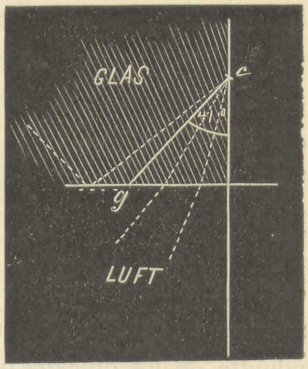
«Ingen lysstraale kan passere et linsesystem i den ene retning, naar den ikke ogsaa kan gaa i den modsatte.

Kun de straaler, der kan træde ud af et system i det foran liggende medium, kan fra dette naa ind i billedrummet.» (Dippel).

Men for at en lysstraale fra et stærkere brydende medium kan komme ind i et svagere brydende, maa den træffe overfladen heraf under en vinkel, der ikke overskrider de to mediers grænsevinkel: den maa ikke totalreflekteres.

Et objektivsystem vil saaledes ikke kunne udnytte til billeddannelsen en straalekegle, der udgaar fra objektet med større vinkel end den dobbelte grænsevinkel, hvorledes end forøvrigt systemets indre bygning er.

Fig. 32.



Totalreflexion.
v = grænsevinhel = 41°.

Hvis man imidlertid ombytter det foran linsen liggende medium med et stærkere brydende, vil grænsevinkelen mellem dette og glasset, og altsaa ogsaa den brugbare straalekegle blive større.

Det er dette, som sker ved de saakaldte immersionslinser. Ved disse anbringes enten en vanddraabe mellem objektet og frontlinsen, vandimmersion, eller en oljedraabe, oljeimmersion. Den benyttede olje har samme brydningsevne som kronglas, danner med dette et optisk homogent medium; oljeimmersionen benævnes derfor ogsaa homogen immersion.

Sammenligner man nu tre saadanne linser, en tørlinse, en vandimmersionslinse og en oljeimmersionslinse, alle konstruerede med den største theoretisk mulige (om end praktisk uudførlige) aabningsvinkel, 180°, vil det straks være klart, at dette tal ikke er udtrykket for deres optiske evne.

Grænsevinkelen mellem	luft	og	kronglas	er = 41°
—»—	—	vand »	—	» = 48°
—»—	—	olje »	—	» = 90°.

Af straaler, som med en 180° vinkel falder ind paa disse linser, vil tørlinsen kun formaa at tilgodegjøre en 82° lyskegle

($2 \times 41°$), vandimmersionslinsen 96°, kun for oljeimmersionen gaar intet tabt. Eller omvendt: en oljeimmersionslinse paa 82° aabning har samme værdi som en vandimmersionslinse med 96° og som en tørlinse med 180°.

For at opnaa en straalebundt med 180° vinkel, maatte objektet selvfølgelig ligge umiddelbart op i frontlinsen. Men da der altid findes en maalbar objektafstand, kan en saa stor vinkel ikke opnaaes. Den høieste praktisk anvendelige aabningsvinkel er neppe større end 150°.

Saavel aabningsvinkelen ($2u$) som brydningsexponenten (n) af det foran linsen liggende medium maa altsaa indgaa i udtrykket for linsens optiske evne (a). Abbe har formuleret dette saaledes:

$$a = n \,.\, \sin. u$$

og kaldt denne værdi numerisk apertur. Denne numeriske apertur er det korrekte udtryk for et linsesystems evne til at udnytte de fra objektet udgaaende lysstraaler, og har afløst den tidligere betegnelse ved aabningsvinkelen alene.

Det vil af dette udtryk sees, at systemer med samme aabningsvinkel forholder sig til hinanden som de foranliggende mediers brydningsexponenter.

For luft er $n = 1{,}00$
» vand » $n = 1{,}33$
» olje (kronglas) er $n = 1{,}52$
» (monobromnaftalin) $= 1{,}66$).

Men ved anvendelse af glasmasse med stærkere brydningsevne kan selvfølgelig en større apertur opnaaes ogsaa med denne vinkel, og man har tidligere, men uden synderligt held, forsøgt at anvende diamant til objektivlinser.

I den sidste tid har Zeiss konstrueret linser af flintglas ($n = 1{,}72$) at bruge med en immersionsvædske af monobromnaftalin ($n = 1{,}66$), hvorved erholdes en apertur af 1,60. Disse linser forlanger imidlertid omhyggelig slebne dækglas af flintglas og af bestemt tykkelse og er meget kostbare, 800 mark.

En aabningsvinkel, $2u$,	10°	20°	30°	40°	50°	60°	70°	80°	90°	100°	110°	120°	130°	140°
svarer til en numerisk apertur														
Tørsystem $n = 1{,}00$	0,09	0,18	0,26	0,34	0,42	0,50	0,57	0,64	0,71	0,77	0,82	0,87	0,91	0,94
Vandimmersion $n = 1{,}33$	0,12	0,24	0,35	0,46	0,56	0,66	0,76	0,85	0,94	1,02	1,09	1,15	1,20	1,25
Homogen oljeimmersion $n = 1{,}52$	0,14	0,26	0,40	0,52	0,64	0,76	0,87	0,98	1,07	1,16	1,24	1,32	1,38	1,43
Monobrom-naftalinimmersion $n = 1{,}66$	0,15	0,29	0,43	0,57	0,70	0,83	0,95	1,07	1,17	1,27	1,36	1,44	1,50	1,56

(Efter Leitz' katalog),

Resolution, definition, penetration.

Ovenfor er bemærket, at et systems evne til at opløse objektet i dets enkeltheder, resolutionen, er direkte afhængig af systemets numeriske apertur.

Ved regelmæssige strukturer (liniesystemer, prøveplader, diatomeer o. l.) spiller ogsaa retningen af det anvendte lys en ikke liden rolle. Ved fine strukturer finder man nemlig, at opløsningsevnen tiltager ved skraat indfaldende lys, saaledes at man ved den skraa belysning faar se strukturdetaljer, der ikke kunde opfattes, naar objektet blev belyst som almindelig, parallelt med den optiske akse. Den skraa belysning er saaledes ved disse objekter jevngod med et tillæg i systemernes apertur, et linsesystem af en bestemt apertur virker med skraat lys som et med næsten dobbelt saa stor apertur med ret belysning. Man faar frem denne skraa belysning, enten ved at stille belysningsspeilet til siden, eller ved i Abbes belysningsapparat at føre blænderaabningen udenfor akselinien. Ved de almindelige histologiske og pathologiske præparater har den skraa belysning dog mindre betydning, dog kan den f. eks. ved isolerede, i undersøgelsesvædsken frit svømmende celler fremkalde tydeligere indtryk af deres legemlighed.

Ogsaa bølgelængden (farven) af det anvendte lys har imidlertid nogen inflydelse: under ellers lige omstændigheder gir det violette (blaa) lys den høieste grad af billedopløsning, idet disse straaler ligger inderst i afbøiningsspektret og saaledes længst kan opfanges af objektivaabningen. Det har derfor ogsaa været foreslaaet at søge den fremtidige udvidelse af mikroskopets optiske evne netop ved anvendelse af det blaa lys, idet man ikke tør vente ved anvendelse af høiere brydende glassorter eller andre konstruktioner at naa stort længer, end man er kommen.

Det theoretiske maximum for et objektivs opløsende evne med det hvide lys af bølgelængde $\lambda = 0{,}00055$ mm. er efter Czapskis beregning 2545 striber pr. mm. med 0,00030 mm. afstand (δ). Ved anvendelse af (formel $\delta = \frac{\lambda}{a}$, for skraat lys $\delta = \frac{1}{2}\frac{\lambda}{a}$) blaat lys med en bølgelængde 0,00035 mm., det laveste, der i lange tider er udsigt til at komme til, vil der kunne skjelnes optil 4667 striber pr. mm. med en afstand af 0,00021 mm. Dette skulde for tiden være at anse som den yderste grænse for mikroskopets evne.

Resolutionens afhængighed af aabningen er mest fremtrædende ved undersøgelsen af regelmæssige strukturer, f. eks. de Noberthske plader, der indeholder rækker af liniesystemer i stadig stigende finheder, eller ogsaa de forskjellige diatomeskaller, der efter sin finhed bruges som prøveobjekter for linsesystemernes godhed (se side 34).

Lige over for smaa gjenstande af uregelmæssig form og anordning, saaledes som tilfældet er i de almindelige histologiske væv, beror afbildningen i ikke liden grad ogsaa paa de lyskontraster, som objektet fremkalder i synsfeltet, paa fordelingen af lys og skygge.

Ved definitionen, begrænsningen, forstaaes objektivets evne til med skarphed at gjengive det mikroskopiske billedes konturer. Denne egenskab er udelukkende afhængig af den fuldkommenhed, hvormed den sfæriske og kromatiske aberration er ophævet, samt af linsernes rigtige centrering (foreningen af alle linsers optiske akser) og fuldkommenheden af deres overfladepolitur, altsaa af lysstraalernes homocentriske forening.

Ved penetration, fokaldybde eller dybdeperspektiv forstaaes objektivsystemets evne til uden indstillingsforandring samtidig at give billeder af flere over hinanden liggende planer i objektet. Den findes kun ved smaa aperturer, hvor spredningskredsene paa begge sider af straalernes foreningspunkt i billedplanet er saa smaa, at de er mindre følelige for øiet, saa at dette ved at akkommodere for de skiftende dybdeafstande kan orientere sig i præparatet. Penetrationsevnen er derfor af megen nytte ved linser med liden forstørrelse.

Ved stærke forstørrelser og store aperturer findes derimod intet dybdeperspektiv. Hvert fokalplan er her stærkt begrænset paa synsaksen. Ved disse linser erstattes dybdeperspektivet ved den skarpe tegning af de ved forandret indstilling paa hinanden følgende billedplaner. Mikroskopet akkommoderer ved mikrometerskruen (cfr. pag. 9).

Følgende tabel (sammenstillet efter Dippel) gir en sammenlignende oversigt over aabningsvinkelens forhold til aperturen hos tørlinser, vand- og oljeimmersioner. Dernæst talværdierne for de ved de forskjellige aperturer naaede ydergrænser for opløsningsevnen, udtrykt ved den mindste stribeafstand ɔ: det høieste antal striber, som kan opfattes ved linser med paagjældende apertur, endelig de hertil svarende naturlige prøveobjekter og angivelse af endel linsesystemer, der opløser disse.

Num. ap. $a = n \cdot \sin \cdot u$	Aabningsvinkel $= 2u$.			Theoretisk grænse for opløsningsevnen.		Prøveobjekter (Diatomeer).	Tilsvarende linsesystemer.
	Tørlinse $n = 1{,}00$.	Vandimm. $n = 1{,}33$.	Hom. imm. $n = 1{,}52$.	Stribeafst. i μ ($^1/_{1000}$ mm.).	Antal striber paa 10 μ.		
0,15	17^0			1,70	6		Leitz obj. 2.
0,20	23^0			1,40	7	Navicula viridis.	Zeiss obj. A. Nachet obj. 3. Swift obj. $1^1/_2$ inch.
0,25	29^0			1,00	10	Nitschia Brebissonii.	
0,30	35^0			0,90	11		Zeiss AA. Nachet 4. Swift $^2/_3$ inch.
0,35	41^0			0,80	12		Zeiss B.
0,40	47^0			0,74	13		Zeiss C.
0,45	53^0			0,70	14	Stavroneis Phoenicenteron.	Leitz 4.
0,50	60^0			0,65	15	Pleorosigma angulat.	
0,55	66^0			0,60	16		
0,60	74^0			0,58	17		Nachet 5.
0,65	82^0			0,55	18		Zeiss D.

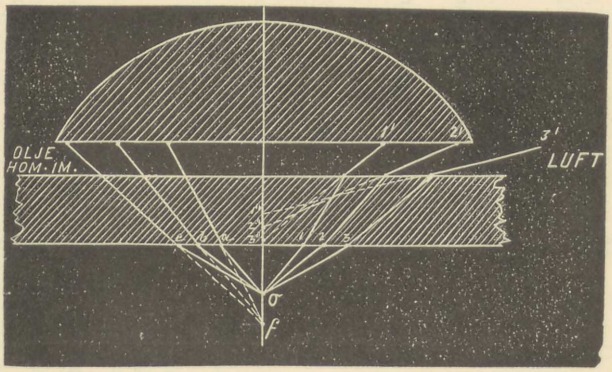
0,70	90°			0,53	19		Swift 1/4 inch.
0,75	97°			0,50	20		Leitz 5 ($a = 0{,}77$).
0,80	106°			0,48	21		Leitz 6 ($a = 0{,}82$).
0,85	116°			0,46	22	Navicula rhomboidea.	Zeiss DD og E. Leitz 7, 8 og 9 (0,87). Swift 1/6.
0,90	128°	85°		0,44	23		Zeiss F. Nachet 6.
0,95	144°	91°		0,42	24	Surirella gemma (tværstribe).	Nachet 7.
1,00	180°	97°	82°	0,41	25		
1,05		104°	86°	0,39	26	Navicula rhomboidea tyr.	
1,10		112°	92°	0,38	27		Leitz 10 vandimmersion. Nachet 9 vandimmersion.
1,15		119°	98°	0,36	28	Nitschia obtusa.	Zeiss H og I vandimmersion.
1,20		128°	104°	0,35			Swift 1/12 vandimmersion. Zeiss 1/12 homogen immersion.
1,25		140°	113°	0,34	29		Swift 1/12 homogen immersion.
1,30		156°	120°	0,335	30		Zeiss 1/12 homogen immersion. Leitz 1/12, 1/16 homogen immersion. Nachet 9, 10, 1/12 hom. immers. Swift 1/12, 1/20, 1/30 hom. immers.
1,35			128°	0,32	31	Nitschia vermic.	
1,40			138°	0,315	31—32	Surirella gemma (længdestribe).	Zeiss Apochr. h. imm. 3 og 2 mm.
1,45			145°	0,30	33		
1,50			161°			Navicula rhomboidea saxon.	Powell and Lealand 1/20 h. imm.
1,52			180°				
					40	Amphiplevra pellucida.	
1,60	Monobromnaftalin.						

Dækglassets virkning.

Ved de fleste mikroskopiske undersøgelser bedækkes objektet med en liden glasplade, dækglasset, i regelen af 0,10—0,20 mm. tykkelse. Hermed faar objektet en mekanisk beskyttelse samt en jevnere og i optisk henseende heldigere overflade.

Dækglasset har imidlertid ogsaa nogen indflydelse paa straalegangen (først paapeget af Amici), hvilket fremgaar af tegningen, hvor forholdene er fremstillet stærkt overdrevne.

Fig. 33.



Dækglassets virkning.

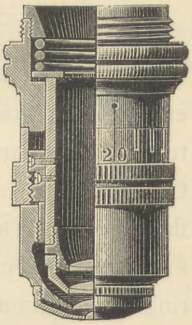
Straalerne *1*, *2*, *3*, fra objektet *(O)* blir ved overgangen fra dækglasset til luften brudt fra indfaldsloddet, faar en større og udover mod periferien stigende divergens. De yderste straaler vil derved ganske gaa tabt for objektivet, de øvrige naar dette under forskjellige vinkler, som om de kom ikke fra et enkelt objektpunkt, *O*, men fra flere over hinanden liggende punkter 1^1, 2^1, 3^1; de vil altsaa ikke af en aplanatisk linse kunne samles homocentrisk og danne et klart og rent, men et paa grund af spredningskredsene forvisket billede. Denne virkning stiger med dækglassets tykkelse.

Men idet linsens randparti træffes af straaler med større divergens end midtpartiet, vil dækglasset modarbeide den sfæriske aberration; af de stærkere brydende randpartier vil der paa grund af dækglasvirkningen ogsaa udfordres en stærkere brydning for at faa straalerne forenede.

Ved de stærkere objektivsystemers konstruktion maa derfor tages hensyn til dækglasvirkningen. Systemet blir sfærisk underkorrigeret svarende til en bestemt dækglastykkelse (i regelen 0,12—0,17 mm), som man da maa benytte for at faa det bedst mulige billede, fast korrektion.

Mange optikere angiver ogsaa paa sine systemer, for hvilken dækglastykkelse de er konstruerede, ligesom Abbe har angivet en prøveplade, «Testplatte», ved hvilken man kan udfinde, for hvilken dækglastykkelse hvert objektiv er bedst korrigeret. Denne prøveplade bestaar af et objektglas, paa hvilket der er anbragt 6 smaa runde dækglas i tykkelserne fra 0,09—0,18 mm. Disse dækglas er paa undersiden belagt med speilbelæg, hvori der er ridset fine parallele linier. Det dækglas, under hvilket de fine linier sees saavel med centralt som med skraat lys klart og uden farverande, er det, for hvilket vedkommende objektiv er bedst korrigeret.

Fig. 34.



Korrektions-indfatning.

Til direkte at maale tykkelsen af et dækglas gives der instrumenter af forskjellige konstruktioner.

Korrektion af dækglasvirkningen kan ogsaa opnaaes ved at forandre afstanden mellem linserne i systemet. Et af linseparrene, i regelen det midterste eller de øverste, forbindes med en om systemet gaaende med inddeling forsynet skruering *(b)*, ved hvis dreining linserne hæves eller sænkes, svarende til den anvendte dækglastykkelse.

En inddeling paa systemets indfatning tjener til at gjenfinde den for hver dækglastykkelse rigtige stilling.

Ved anvendelsen af denne korrektionsindfatning kan man saaledes bruge forskjellige dækglastykkelser, man er ikke bundet til en enkelt.

Paa disse maader kan opnaaes dækglaskorrektion for de straaler, som kommer ind i objektivet (fig. 33, *1*, *2*). Men tabet af de yderste straaler kan herved ikke forebygges. (Fig. 33, *3*).

Her viser atter immersionslinserne sin overlegenhed. Idet luftlaget mellem dækglas og linse byttes med et vand- eller oljelag, formindskes eller ophæves den ved dækglasset foraarsagede spredning, og straalerne gaar ubrudte og retliniede fra objektpunktet ind i linsesystemet (fig. 33, *a*, *b*, *c*), saa de efter brydningen forenes homocentrisk. De homogene immersionslinser bevirker saaledes den fuldstændigste dækglaskorrektion.

---

2. Okularet.

Okularet bestaar af to plankonvexe linser, fæstede i begge ender af en kort cylinder, som sættes ind i den øvre ende af tuben. Sædvanlig benyttes det saakaldte Huygenske (eller Campanis) okular, hvor begge linser vender den konvexe flade nedad. Den øverste linse kaldes øielinsen, den nederste samlelinsen, kollektivlinsen. Imellem disse findes en ringformig blænder.

Dersom okularet kun bestod af en enkelt linse, vilde man med denne som lupe ikke kunne overse objektivbilledet i hele dettes udstrækning, de yderste partier deraf vilde gaa tabt.

Desuden — objektivbilledet ligger ikke udbredt i et plan, men opadkrummet i en kugleflade, hvilket ved betragtning gjennem et enkelt okular vilde foraarsage et fortrukket billede og

nødvendiggjøre forskjellig indstilling for midten og randpartierne af synsfeltet.

Kollektivlinsen samler de fra objektivet kommende straaler og bringer dem til forening tidligere, end de ellers vilde

Fig. 35.

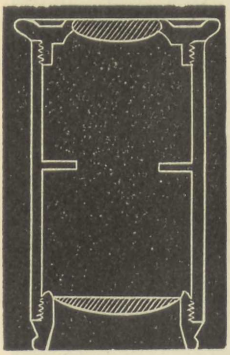
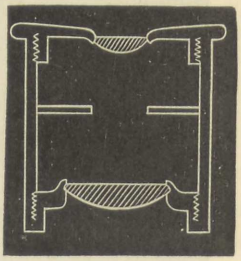


Fig. 36.



Tegning af okularer i gjennemsnit.

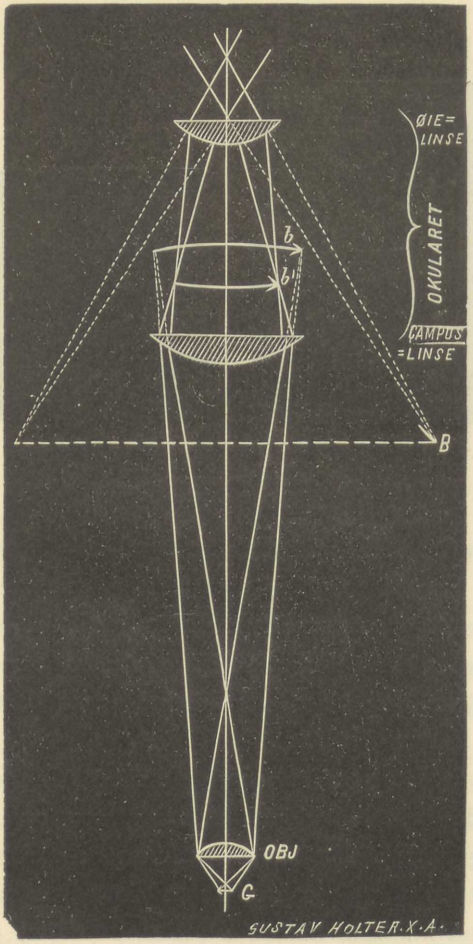
have dannet billedet. Okularblænderen anbringes netop her. Billedet blir derved mindre i udstrækning, saa det i sin helhed kan iagttages gjennem øielinsen, men omfatter hele objektivbilledet. Det virkelige synsfelt *(campus visus)* forstørres saaledes ved kollektivlinsen, som derfor ogsaa kaldes campuslinsen.

Af fig. 37 sees, at det af gjenstanden *(G)* gjennem objektivet dannede billede *b* (der har konvexitet opad og saaledes ikke kan iagttages i hele sin udstrækning af øielinsen uden forandret indstilling), ved campuslinsen forandres til det noget mindre, nedad konvexe billede b^1, der betragtet gjennem øielinsen giver det endelige, forholdsvis plane billede *B*.

Ved rigtigt valg af okular- og kollektivlinsernes krumning og indbyrdes afstand kan nemlig ogsaa billedets krumning og fortrukkethed modarbeides, ligesom samtidig ukorrigerede aberrationsrester kan ophæves.

Den ved okularet bevirkede forstørrelse kan ved middels stærke akromatiske tørlinser ikke med fordel drives

Fig. 37.



Samlet objektiv-, kollektiv- og okularvirkning.
(Meissel XIV, 13).

over 3—4 gange; ved vandimmersionslinser til 5—6 og ved homogen immersion til 7 à 8, høist 9 gange.

Ved apokromaterne (se pag. 19) derimod kan paa grund af den her existerende særdeles fuldkomne straaleforening benyttes okularforstørrelser op til 12—15, ja endog 18 og 24 gange (kompensations), og medens man ved arbeidet med de almindelige akromatiske linser er nødt til at skifte objektivsystem, naar objektet skal undersøges ved forskjellige forstørrelser, kan dette ved apokromaterne i stor udstrækning opnaaes blot ved ombytning af okular.

Det bør erindres, hvad tidligere er omtalt, at kompensationsokularerne er konstruerede med en bestemt feil (for at kompensere den kromatiske forstørrelsesdifferens ved de stærkere apokromater), og saaledes ikke kan anvendes ved de almindelige akromatiske linser, hvor denne kompensation ikke er paakrævet.

Okularerne betegnes i regelen ligesom objektiverne ganske vilkaarligt med tal eller bogstaver (I, II, III, IV osv.). Ved kompensationsokularerne har Zeiss imidlertid indført den mere rationelle betegnelse efter okularets egenforstørrelse. Ved anvendelse af kompensationsokular 4, 8 eller 12 bliver altsaa objektivbilledet forstørret 4, 8 eller 12 gange. Enkelte amerikanske fabrikanter har dog allerede tidligere benyttet dette betegnelssystem for de sædvanlige okularer.

Foruden de almindeligst anvendte Huygenske okularer har man ogsaa anvendt andre konstruktioner, saaledes Ramsdens okular, der ligeledes bestaar af to plankonvexe linser, men med de konvexe flader mod hverandre, det billedomdreiende okular, og det holosteriske okular eller fuldglasokularet, hvilket sidste bestaar af en eneste massiv glasmasse med sfæriske flader opad og nedad (omtrent som en saakaldet Coddingtons lupe). Projektionsokularet (Abbe) anvendes ved mikrofotografi.

Til okularsystemet hører endelig ogsaa mikroskoprøret, tubus. Med en større tubuslængde ɔ: afstand fra objektivet til okularet øges nemlig selvfølgelig billedafstanden og dermed ogsaa billedets fladeudbredning; forlængelse (udtrækning) af tuben medfører saaledes en stærkere lineær forstørrelse. Imidlertid gjælder det om denne som om okularforstørrelsen, at den kun frembringer en større udstrækning af objektivbilledet og medfører formindskelse af billedets lysstyrke.

Desuden maa det bemærkes, at særlig alle stærkere objektivsystemer er konstruerede for en bestemt tubuslængde, der sammen med dækglastykkelsen indgaar som led i systemets korrektion, og udenfor hvilken systemet saaledes ikke kan ventes at være fuldt ud tilfredsstillende. Forandringer i tubuslængden kan saaledes ikke rent vilkaarligt finde sted.

De kontinentale mikroskoper har i regelen en tubuslængde paa 140—200 mm., og i regelen er det optiske apparat i den senere tid beregnet paa en tubuslængde af 160 mm. De engelske og amerikanske instrumenter har derimod en tubuslængde af 250—400 mm. Derfor kan linser, konstruerede for kontinentale stativer, ikke uden videre anvendes paa engelsk-amerikanske instrumenter eller omvendt.

---

b. Belysningsapparatet.

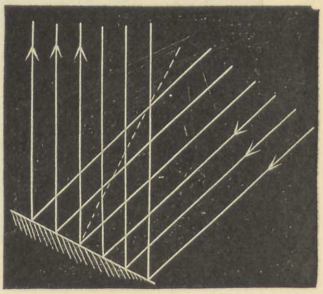
Ved den mikroskopiske undersøgelse iagttages nu for tiden gjenstanden som regel ved gjennemfaldende lys.

Som lyskilde anvendes helst rent, hvidt dagslys, saaledes som det viser sig tilbagekastet fra et let skylag, en hvid væg eller lignende. Direkte sollys bør undgaaes. Som kunstig lyskilde kan bruges en roligt brændende lampe eller gasflamme (gjerne naftalinlys eller en Auers brænder). De mange gule og røde straaler i det kunstige lys

afdæmpes med fordel af en blaalig glasplade. Det elektriske lys, der indeholder mange straaler fra spektrets violette del, har vist sig meget fordelagtigt til brug ved mikroskopering.

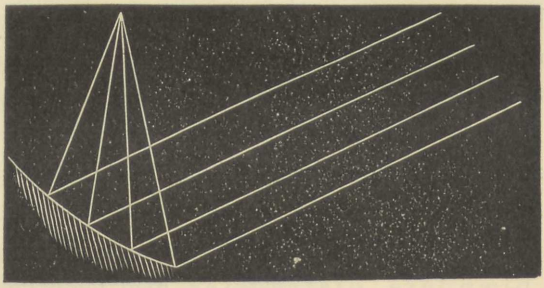
Lyset opfanges af det under stativets bord anbragte speil, der paa den ene side er plant, paa den anden side konkavt.

Fig. 38.



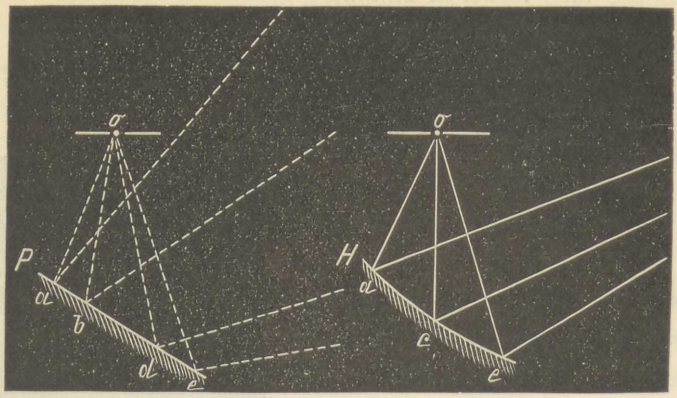
Planspeilet reflekterer efter theorien de fra et fjernt lysende punkt kommende parallele lysstraaler parallelt op mod objektet (se fig. 38), ligesom de fra en nærstaaende lyskilde udgaaende divergentsstraaler efter reflexion i planspeilet beholder sin divergens. Planspeilet er derfor mindre hensigtsmæssigt ved kunstigt lys. Hulspeilet derimod reflekterer dagslysets parallele straaler med konvergens op mod brændpunktet, og frembringer saaledes en kraftigere belysning af gjenstanden (se fig. 39).

Fig. 39.



Giltay har imidlertid vist, at ogsaa planspeilet dog i virkeligheden leverer konvergerende lys. Da lyskilden nemlig ikke er et lysende punkt, men gjerne har en vis udstrækning, vil straaler fra forskjellige dele af lyskilden kunne træffe speilet under saadanne vinkler, at der fra dettes hele flade reflekteres lys op mod det lille objekt. Et blik paa tegningen (fig. 40)

Fig. 40.



Straalegang ved
planspeil hulspeil.

vil imidlertid vise, at medens planspeilet, *P*, tiltrænger en lyskilde af meget betydelig udstrækning for at præstere lyskeglen *a o e*, kan hulspeilet, *H*, udføre dette allerede med divergent indfaldende straaler. Hulspeilet vil saaledes med samme lyskilde give en større lysmængde end planspeilet.

Belysningen er enten c e n t r a l, naar de fra speilet tilbagekastede straalers hovedretning falder sammen med mikroskopets optiske akse, eller den kan være s k j æ v, naar lysbundten sendes ind paa gjenstanden i en større eller mindre vinkel med denne akse. I visse tilfælde kan man med skjæv belysning opnaa en større optisk virkning (se side 32).

For at kunne opfange lyset fra alle kanter og for at kunne skifte fra c e n t r a l til s k r a a er speilet bevægeligt anbragt.

Den paa objektet indfaldende lysmængde reguleres ved hjælp af b l æ n d e r e, d i a f r a g m e r, med forskjellig aabning, der indsættes i eller lige under mikroskopbordet, og hvorved lyskeglens størrelse kan afpasses efter behovet.

Abbes belysningsapparat.

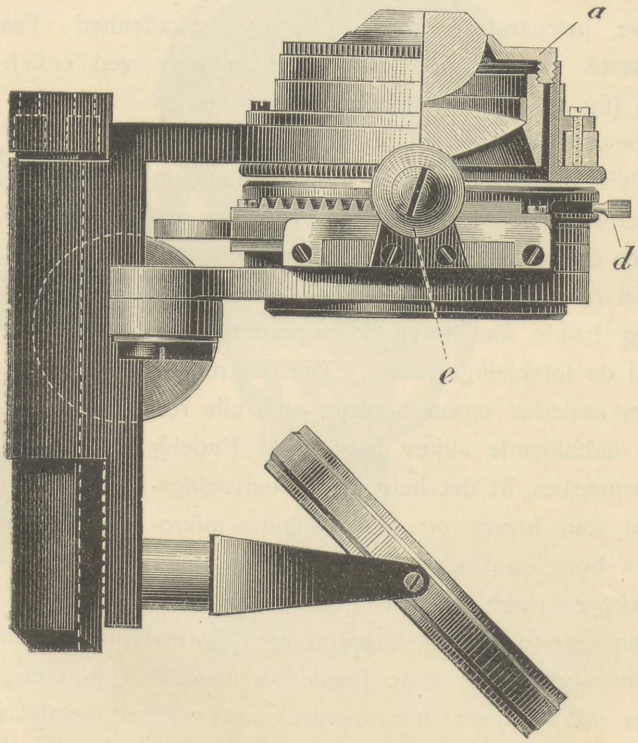
Under visse forhold er det nødvendigt at belyse gjenstanden med straaler af en langt stærkere konvergens end den af hul-

speilet frembragte. Man indsætter da i mikroskopets bord en kondensor, en stærk plankonvex samlelinse, der sender de fra speilet kommende straaler mod objektet under en meget stor vinkel.

Til forstærkelse af virkningen kan flere linser kombineres. Saadanne kombinationer er allerede for længe siden konstrueret af Dujardin, af Nachet, og de har længe været i brug i England. Paa fastlandet har de først faaet sin egentlige udbredelse i Abbes belysningsapparat, der med stor fuldkommenhed tilfredsstiller saavel de optiske som mekaniske fordringer.

Abbes belysningsapparat bestaar af en af 2 (i tilfælde 3)

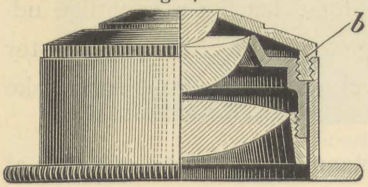
Fig. 41 a.



Abbes belysningsapparat.

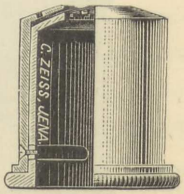
linser dannet kondensor med en konvergensvinkel paa 120 til 144 grader. Powell og Lealand i London har endog konstrueret et belysningsapparat med 170° konvergens. Skal imidlertid en saa stor straalekegle kunne tilgodegjøres fuldt ud, maa rummet mellem kondensorens øverste linse og objektglassets underflade udfyldes med en draabe immersionsolje for at undgaa lystab.

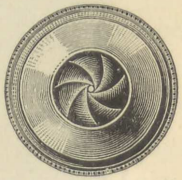
Fig. 41 b.



Den fulde virkning af disse stærke kondensorer er dog kun i visse tilfælde paakrævet, ofte er den endog hinderlig for iagttagelsen. Abbes apparat er derfor forsynet med blændere, hvorved lyskeglen kan indsnevres efter behov ɔ: overensstemmende med den benyttede forstørrelse, præparatets natur og lysets beskaffenhed. Paa den eleganteste maade imødekommes disse krav ved irisblænderen (fig. 42), ved hvis hjælp man kun ved en liden bevægelse af en knap (Fig. 41 d.) gradvis kan udvide og indsnevre den gjennem kondensorlinserne passerende lyskegle. I Abbes apparat er denne irisblænder anbragt paa en med tandhjul *(e)* bevægelig slæde, saa blænderens aabning baade kan føres ud i periferien og stilles i de forskjellige radier. Paa den maade kan der saaledes ogsaa opnaaes en i alle retninger indfaldende skjæv belysning. Endelig maa bemærkes, at det hele Abbes belysningsapparat kan hæves og sænkes under mikroskopets bord, saa ogsaa herved fremkommer en række nuancer i belysningen. Da apparatet i sin høieste stilling koncentrerer lysstraalerne omtrent paa objektivet, vil dette, naar kondensoren sænkes, komme til at belyses af de efter konvergensen atter divergerende stadig spidsere straalekegler. Ogsaa paa denne maade kan lysvirknin-

Fig. 42.

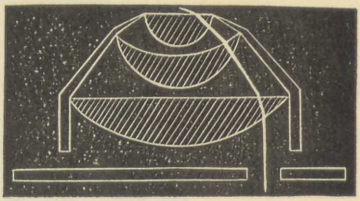




Irisblænder.

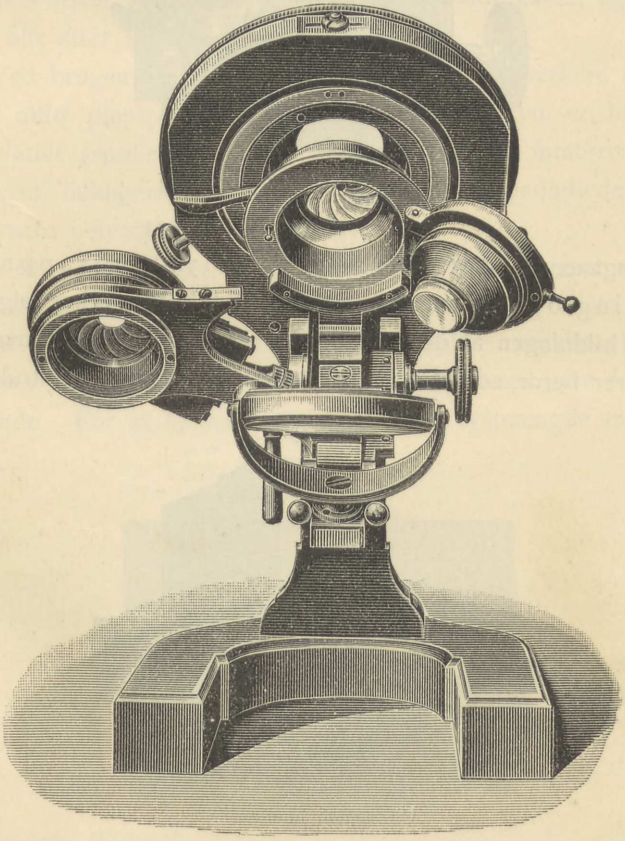
gerne i høi grad varieres. Jo mere apparatet sænkes, desto mere nærmer de objektet træffende straaler sig til at være parallele, altsaa ligne belysningen uden kondensor. Særlig til mikrofotografisk brug anvendes nu gjerne de især i England meget benyttede akromatiske kondensorer.

Fig. 43.



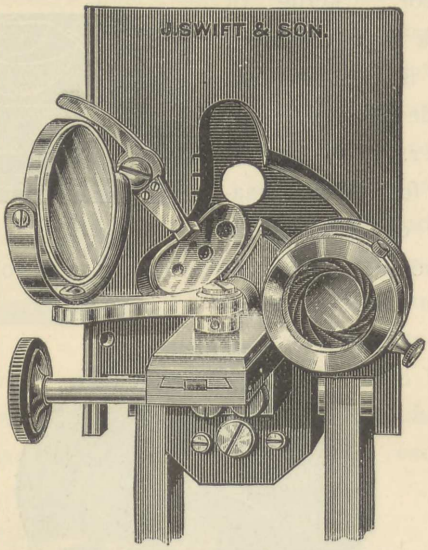
Der gives forskjellige maader til hurtigt og bekvemt at fjerne kondensoren, naar man ønsker at gaa over til den al-

Fig. 44 a.



mindelige belysning direkte fra speilet. Etpar maader at løse denne opgave viser fig. 44 a og b.

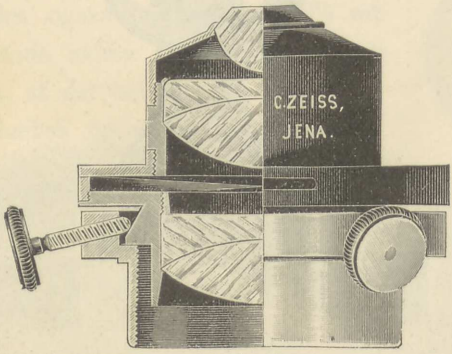
Fig. 44 b.



Angaaende det Abbeske belysningsapparats virkning og praktiske anvendelse bemærkes følgende:

Afbildningen af de histologiske præparaters uregelmæssige strukturer beror, som før omtalt, væsentlig paa den af strukturen

Fig. 45.



Akromatisk kondensor.

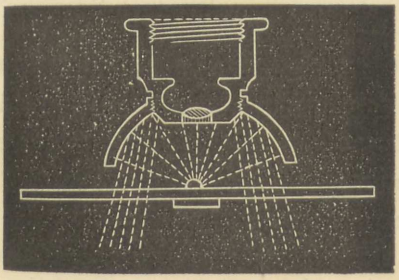
fremkaldte fordeling af lys og skygge, saaledes som denne opstaar ved parallele eller lidet konvergerende straaler.

Ved anvendelsen af det stærkt konvergerende lys fra en Abbes kondensor ophæves nu denne skyggedannelse næsten fuldstændig, de af den ene straalebundt fremkaldte virkninger ophæves af de fra modsat hold kommende. Følgen er, at «strukturbilledet» forsvinder, medens derimod farvede dele af objektet fremtræder skarpt. Heraf fremgaar, at Abbes kondensor med fuld aabning væsentlig er til nytte ved undersøgelse af smaa farvede gjenstande, hvorfor apparatet ogsaa har en saa stor betydning ved bakterieundersøgelsen, ved finere cellestudier osv. Vil man saa iagttage strukturbilledet, snører man blot irisblænderen sammen, lyskeglen indsnevres, og strukturen blir atter synlig.

Ved brugen af Abbes kondensor bør ved stærkere forstørrelser altid planspeilet anvendes, da kondensoren er indrettet for relativt parallele straaler. Ved de svagere forstørrelser er hulspeilet heldigere, da det under disse omstændigheder giver en jevnere belysning af synsfeltet.

I det daglige ser vi de gjenstande, som omgiver os, ved hjælp af det fra dem reflekterede paafaldende lys. Kun sjelden anvendes dette ved den mikroskopiske undersøgelse nu for tiden, og da kun ved studiet af gjenstandenes ydre form og overflade. For at opnaa den tilstrækkelige lysmængde anvendes

Fig. 46.



Lieberkühns parabolspeil.

da enten en kraftig samlelinse, der koncentrerer lyset paa gjenstanden, eller forskjellige reflektorer f. eks. det Lieberkühnske parabolspeil, der skrues fast paa objektivsystemets nederste side og reflekterer de fra det under bordet værende speil opsendte straaler koncentrisk ned paa gjenstandens overflade. Gjenstanden maa selv hvile paa et ugjennemsigtigt stof.

PRØVING AF MIKROSKOPET.

De fordringer, man maa stille til et godt mikroskop, og som ved anskaffelse bør paasees fyldestgjorte, er følgende:

Stativet maa være passende tungt, have en solid og bred fod og staa ganske støt;

alle faste sammenføininger maa være urørligt forbundne;

alle bevægelige forbindelser maa gaa jevnt og sikkert, og bevægelsen kun foregaa i samme linie eller samme plan, uden sideafvigelser; saaledes indstillingsbevægelsen kun i den optiske akse, ombøiningen af mikroskopet kun i sagittalplanet;

specielt maa paasees, at mikrometerskruen bevæger sig let i begge retninger og virker hurtigt og paalideligt uden dødgang;

og endelig bør stativet have en vakker og tiltalende form og være smukt udført. Det skaffer glæde og hygge ved arbeidet.

Linserne maa alle give lyse, klare, skarpt begrænsede billeder uden farverande, ikke fortrukne og uden særligt fremtrædende billedkrumning. De stærkere linser maa have en tilstrækkelig apertur, hvilket kan prøves ved at opløse de passende diatomeer (se tabel side 31) eller ved hjælp af særegne instrumenter f. eks. det af Abbe konstruerede apertometer. Endelig bør man foretrække objektiver med stor arbeidsafstand.

Til almindelige histologiske og pathologiske undersøgelser passer bedst forstørrelser fra ca. 50 til 300 gange (Zeiss A og D eller E, Leitz 4 og 6 eller 7, Hartnack 3 og 7, Swift $^1/_2$, $^1/_4$ og $^1/_6$ inch). Til finere undersøgelser, saasom bakterieundersøgelser og lignende, udkræves desuden en linse til homogen immersion $^1/_{10}$, $^1/_{12}$ eller $^1/_{16}$ samt Abbes belysningsapparat.

De kostbare apokromater kan undværes til almindelig praktisk brug.

Saafremt man ikke har adgang eller evne til paa forhaand at underkaste instrumentet fornøden prøve, bør man ved anskaffelser holde sig til de store, velkjendte fabriker; undgaa bestemt de billige instrumenter med de stærke forstørrelser.

Man staar sig paa straks at anskaffe et nogenlunde støt og fuldkomment stativ, selv om det optiske udstyr fra begyndelsen af er beskedent. Thi kun de bedre og finere stativer tillader benyttelsen af de finere optiske apparater, som man senere faar brug for.

For at prøve den ved mikroskopet frembragte forstørrelse anvender man følgende fremgangsmaade:

Under mikroskopet lægges et objektivmikrometer (side 56), paa hvis inddeling (1 millimeter delt i 100 dele), der nøiagtig indstilles. Ved hjælp af et tegneprisme (side 60) projiceres billedet heraf ned paa et i billedafstanden ɔ: 250 mm.s afstand anbragt papir. Billedet optegnes her med blyantstreger, og det rum, et vist antal af disse optager, maales med et almindeligt millimetermaal. Forholdet mellem det projicerede billede og maalestokken angiver da forstørrelsen.

Har man fundet, at 13 af de projicerede delestreger svarer til 10 millimeter, er forstørrelsen altsaa ca. 77 gange ($\frac{13}{100} \times 10 = 76{,}9$).

Maalingen kan ogsaa udføres uden tegneprisme saaledes: med venstre øie iagttages det mikroskopiske billede af objektivmikrometeret, medens høire øie indstilles paa papiret i 250 mm.s afstand. Billederne i begge øine bringes nu til at falde sammen, hvorpaa mikrometerinddelingen optegnes paa papiret med blyant. Derefter maales som ovenfor angivet. Denne methode med dobbelt syn er dog vanskeligere end den første, da den kræver endel øvelse.

BEHANDLING OG BRUG AF MIKROSKOPET.

Al voldsom behandling som stød, slag eller fald maa undgaaes, særligt for linsesystemernes vedkommende, da disse let kommer i uorden ved stærkere rystelser.

Stativet holdes rent ved afpudsning med en tør, fin linklud. Har der sat sig smuds omkring tuben osv., aftørres det her og inde i hylsen ved hjælp af lidt xylol eller benzin. Olje bør ikke bruges.

Mikrometerskruen bør ikke skrues helt op eller helt ned; særlig bør den ikke søges dreiet videre med kraft, naar den stopper eller gaar trangt.

Man bør løfte og hæve mikroskopet efter foden, ikke efter den horizontale tværarm, da hele vægten i saa fald hviler paa mikrometerskruen.

Linsesystemerne maa ikke unødigen skrues fra hverandre. De maa heller ikke tilsøles med reagenser eller indleiringsstoffe. Løft derfor linserne vel op fra mikroskopets bord, naar præparaterne lægges under eller tages bort.

Stærk alkohol, chloroform, terpentin, benzin, xylol eller lignende kan opløse kanadabalsamen, hvormed linserne er fæstet til hverandre, kalilud angriber glassenes politur.

Linserne befries for vedhængende kanadabalsam ved hurtig aftørring med en i xylol eller benzin dyppet blød gammel linnedklud eller semsket skind. Aftørres til slut paa den nyvaskede haandryg. Immersionsolje fjernes fra linsen med en benzinklud straks efter brugen, ellers kan den tykne til og danne et harpixagtigt belæg.

Gnidningen maa ikke udføres for haardt, og den benyttede klud maa være ganske fri for sandkorn eller lignende, der kan sætte riper.

Naar mikroskopet ikke bruges, maa det beskyttes mod støv og lys. Man kan bruge en glasklokke eller glaskasse, der mod

vinduessiden er malet sort eller blaa, et paphylster eller lignende, for saa vidt man ikke for hver gangs brug lægger instrumentet ned i kassen. Meget hensigtsmæssige er de i den senere tid efter engelsk mønster ogsaa paa fastlandet brugte smaa skablignende kasser, hvor instrumentet indsættes i staaende stilling med paaskruede linser færdigt til brug.

Mikroskopet bør anbringes paa et solid, fast bord af saapas størrelse, at der ogsaa er plads til de nødvendige reagenser og hjælpeinstrumenter; helst ved et vindue, som vender mod vest eller nord; direkte sollys bør undgaaes, men kan i nødsfald afblændes ved en hvid skjærm (papir) i vinduet.

Idet man begynder sin mikroskopiske undersøgelse af et objekt, sørges der først for, at tilstrækkeligt lys af speilet kastes ind i mikroskopet, hvilket kjendes paa, at det hele synsfelt, seet gjennem okularet, findes jevnt og kraftigt belyst.

Efterat objektet er lagt paa instrumentets bord sænkes tuben, indtil frontlinsen omtrent staar i arbeidsafstand fra gjenstandens overflade. Arbeidsafstanden (frontalafstanden) er selvfølgelig størst ved de svagere linser. Hvor denne grove indstilling ikke foregaar ved hjælp af tandhjulmekanisme, men gjennem forskyvning af tuben med haanden, bør røret gives en skruende bevægelse, ikke trykkes lodret nedad, da objektivet ellers let kan plumpe ned i det underliggende præparat, saa baade dette og linsen ødelægges.

Hvis præparatet endnu ikke er synligt og tydeligt, dreies mikrometerskruen under stadig kontrol af øiet opover, mod solen, da man ved den grove indstilling kan være kommen indenfor fokalvidden, saa yderligere nedskruen, især ved de stærkere linser, vil trykke objektivet ned i præparatet. Blir billedet herved utydeligere, ligger altsaa fokalafstanden nedenfor, og man kan da trøstig skrue mikrometerskruen nedover, med solen, indtil objektet er rigtig indstillet.

Ved ombytning af præparat bør tuben altid først løftes lidt, og præparaterne aldrig skyves frem og tilbage under den

indstillede linse. Dels ligger nemlig ofte omkring dækglasset ophøiede rande af indleiringsmaterialet, kanadabalsam eller glycerin, som kan tilsøle linsen, dels er saavel dækglas som især objektglas gjerne af forskjellig tykkelse, saa at man ved de stærkere systemer risikerer at støde op i linsen, hvorved enten denne eller præparatet selv kan beskadiges.

IAGTTAGELSEN I MIKROSKOPET.

Det mikroskopiske billede ligger i den tydelige synsvidde, ca. 25 ctm. fra øiet.

Arbeidet med mikroskopet vil under vanlige forhold derfor ikke anstrænge øiet og er heller ikke skadeligt. Men da man ofte ubevidst søger billedet langt nærmere øiet og ved at indstille objektivet ogsaa kan faa det henlagt i en kortere afstand, fremkaldes herved en akkommodationsanstrængelse, der kan virke trættende. Man bør derfor altid henlægge billedet i almindelig tydelig synsvidde. Dette lettes betydeligt, naar man under mikroskoperingen holder ogsaa det ubenyttede øie aabent, hvilket med nogen øvelse ikke falder vanskeligt.

Ved passende, ikke for intens lys og ikke altfor fine objekter kan man holde ved at mikroskopere i timevis. Dog trættes efterhaanden retina ved det stadig paa samme sted faldende lysbillede, og iagttagelsens skarphed aftager. Er lyset for stærkt, blir øiet let blændet, er lyset for svagt, trættes man ved øiets famlen efter at indstille rigtigt for de utydelige detaljer. Ved finere undersøgelser bør derfor ikke fortsættes mere end en halv time ad gangen.

Selve den mikroskopiske iagttagelse frembyder en del særegenheder, som ofte kan virke forstyrrende og forvildende paa begynderen.

Først er nu billedet omvendt. Hvad der er opad, viser sig nedad, ligesom ogsaa høire og venstre er omvendt. Alle bevægelser, som foretages med objektet, synes i mikroskopet derfor ogsaa at foregaa den modsatte vei.

Dernæst undersøges i mikroskopet gjenstandene ved gjennemfaldende lys, medens vore synserfaringer fra det daglige liv saa godt som udelukkende beror paa iagttagelsen af det fra gjenstandenes overflade reflekterede lys. Øiet modtager i mikroskopet derfor kun undtagelsesvis overfladebilleder. Hvad vi gjennem mikroskopet opfatter af gjenstanden, er derimod de med indstillingen skiftende optiske tværsnit af samme. Det er ved kombinationer af disse, at vi danner os et begreb om gjenstandens form, udstrækning, dybdeforhold samt indre enkeltheder. Derimod kan dybdeforholdene i mikroskopet kun undtagelsesvis bedømmes (cfr. side 33) ved hjælp af øiets akkommodation, saaledes som vi gjør i det daglige liv. Linsesystemer med liden aabning (og svag forstørrelse) tillader vistnok øiet at indstille sig ogsaa for billeder, der hidrører fra dele af gjenstanden, der ikke nøiagtig ligger i fokalafstanden, da spredningskredsene ved saa spidsvinklede straalekegler er meget smaa. Men ved linser med stor aabning (og stærk forstørrelse), hvor fokalplanet er stærkt begrænset paa den optiske akse, er der saa godt som intet dybdeperspektiv (se side 33); udenfor det indstillede objektplan sees intet. Her maa udelukkende akkommoderes med mikrometerskruen.

Fremdeles er det mikroskopiske billede ogsaa egenartet derved, at det dannes ikke alene af det direkte retliniede lys, men ogsaa af afbøiede straaler.

Endelig modtager det mikroskoperende øie paa grund af linsernes apertur en større del af de fra gjenstanden udgaaende lysstraaler end i det daglige liv, og faar derved ogsaa et andet og fyldigere indtryk. Medens vinkelen af den straalekegle, der under daglige forhold fra en gjenstand i almindelig arbeidsafstand kan passere pupillen, er nogle faa grader, optager øiet

jo gjennem mikroskoper straalekegler paa 150° vinkel og mere. Fol har sammenlignet dette med den maade, hvorpaa visse insekter f. eks. edderkoppen, med dens talrige og langt fra hverandre staaende øine, sandsynligvis opfatter den synlige verden.

MAALING AF MIKROSKOPISKE GJENSTANDE.

Den mikroskopiske maaleenhed er $^1/_{1000}$ millimeter (0,001 mm.), der benævnes mikromillimeter eller mikron og betegnes med det græske bogstav μ (my).

Maaling i mikroskopet udføres lettest og for de fleste formaal med en fuldt tilfredsstillende nøiagtighed ved hjælp af et objektiv- og et okular-mikrometer.

Objektivmikrometeret bestaar af et paa et almindeligt objektivglas fæstet dækglas, hvorpaa med delemaskine er indridset en millimeter delt i 100 dele, altsaa med en linieafstand lig $^1/_{100}$ mm. (= 10 μ). Objektivmikrometeret lægges som objekt under mikroskopet, der indstilles nøiagtigt paa inddelingen.

Okularmikrometeret er ligeledes en glasplade med inddeling, men pladen er rund og inddelingen grovere f. eks. 5 mm. delt i 50 dele. Okularmikrometeret indlægges i okularet paa den derværende blænder, hvilket svarer saavel til objektivbilledets plads (fig. 35 og 36), som til rigtig objektafstand for okularets øielinse. Ved enkelte okularer (mikrometerokularer) kan øielinsen endog særlig indstilles paa dette punkt. Naar mikroskopet er indstillet, falder billederne af de to mikrometerskalaer paa hinanden og kan direkte sammenlignes. Mikroskopets tubus forlænges eller forkortes nu, indtil et bestemt antal af okularmikrometerets afdelinger nøie falder sammen med et antal af objektivmikrometerets. Begge rækker tælles. Falder f. eks. 7 objektivmikrometerdele (à 0,01 mm.) sammen med 16 af okular-

mikrometerets dele, da er værdien af hver af disse $\frac{7 \times 10 \mu}{16} = 4{,}4 \mu$.

Paa denne maade bestemmes værdien af okularmikrometerets linieafstande for alle objektiv- og okularkombinationer, idet samtidig den i ethvert tilfælde anvendte tubuslængde noteres.

Er nu linieafstandenes værdi i okularmikrometeret kjendt, bruges til praktiske maalinger udelukkende dette, idet man saaledes direkte maaler størrelsen af objektets detaljer. Med en smule øvelse kan man ogsaa bedømme størrelsen af objekter ned til $^1/_5$—$^1/_{10}$ af linieafstanden. Man bør som regel kun bruge midten af skalaen, da udkanterne paa grund af okularbilledets fortrækning giver unøiagtige resultater.

Flere af de større optikere leverer nu tabeller over okularmikrometerets værdi ved de forskjellige linsekombinationer, saa man fritages fra saaledes som ovenfor vist at bestemme værdierne selv. Man behøver saaledes kun at anskaffe et okularmikrometer (ca. 5 kr.).

For i en fart at kunne gjøre en tilnærmelsesvis slutning angaaende udstrækningen af større gjenstande eller dele af objektet er det hensigtsmæssigt engang for alle ved hjælp af et objektivmikrometer at have maalt synsfeltdiameteren ved de forskjellige objektiver. Det er da let at bedømme gjenstandens udstrækning i forhold til denne kjendte størrelse. Zeiss angiver i sin sidste katalog objektivt synsfelt for alle sine objektiver.

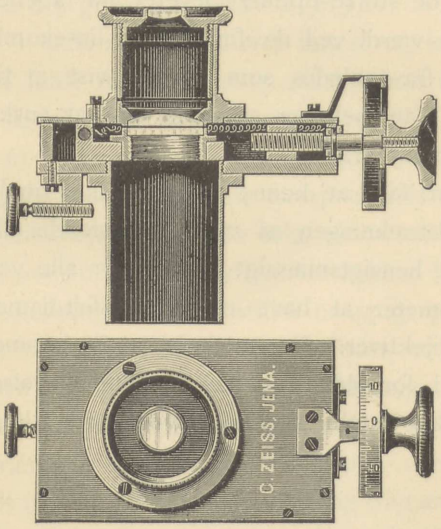
Foruden disse glasmikrometere har man ogsaa anvendt skruemikrometere, der dels anbringes paa objektbordet, dels i okularet.

Objektbordmikrometeret bestaar i en slæde, der ved en fin skrue bevæges tværs over mikroskopets bord, og hvori objektglasset fæstes. I okularet er anbragt en fin spindelvævstraad. Gjenstanden, der skal maales, anbringes saaledes,

at dens ene rand synes at berøre traaden i okularet, objektet bevæges ved hjælp af skruen, indtil den anden rand berører traaden, og man aflæser paa skruens inddelte hoved den strækning, som præpararet er bleven forskudt.

Okularskruemikrometeret virker derved, at en i okularet anbragt fin traad eller linie ved en skrue føres tværs over synsfeltet, fra gjenstandens ene side til den anden, hvorefter forskyvningen aflæses paa skruens krone. Men selvfølgelig har dette okularmaal skiftende værdier alt efter den benyttede forstørrelse og maa beregnes herefter. Methoden giver særdeles nøiagtige resultater.

Fig. 47.



Skrueokularen i kronenden.

Dybdemaaling kan udføres ved hjælp af mikrometerskruen, naar dennes stigning er kjendt. De større nyere mikroskoper har gjerne paa mikrometerskruen en inddeling, der direkte angiver høideforskjellen i indstillingen. Man indstiller først nøiagtigt paa gjenstandens øverste, dernæst paa dens nederste punkt og aflæser differensen. Saafremt gjenstanden og

objektivlinsen befinder sig i samme lysbrydende medium (f. eks. luft), angiver den fundne differens direkte gjenstandens tykkelse.

Befinder gjenstanden sig i et andet medium (f. eks. glycerin, kanadabalsam), maa den fundne værdi multipliceres med kvotienten mellem det første og det andet mediums brydningsindex. Saaledes ved overgang fra kanadabalsam (glas) til luft med 1,5 $\left(\frac{1,5}{1}\right)$, fra kanadabalsam til vandimmersion 1.13 $\left(=\frac{1,5}{1,33}\right)$; fra kanadabalsam til homogen immersion behøves igjen ingen saadan korrektion, da brydningskoefficienten her er den samme.

MIKROSKOPISK TEGNING. TEGNEAPPARATER.

Enhver mikroskopiker bør kunne tegne efter det mikroskopiske billede. Derved skjærpes øiet, opfatningen og hukommelsen.

Al mikroskopisk tegning maa udføres med den høieste grad af nøgtern paalidelighed, med fuld korrekt gjengivelse af det seede. Man maa i lige grad vogte sig for mere eller mindre ubevidst overdrivelse af, hvad der forekommer en at være karakteristisk, og for en skematisk vanemæssig gjengivelse af gjenstanden. Enhver tegning maa gjengive gjenstanden nøiagtig som den viser sig.

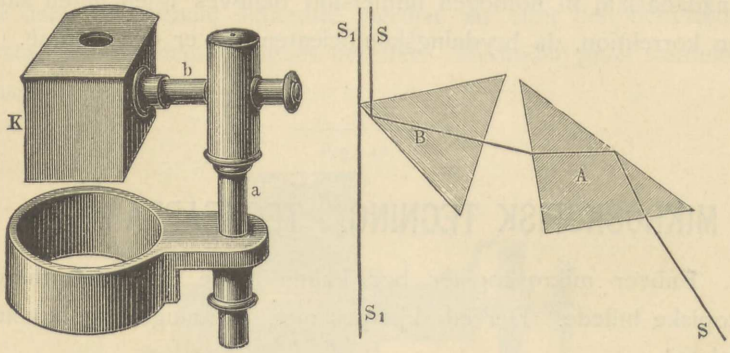
Et vist valg mellem, hvad der forekommer iagttageren væsentligt eller uvæsentligt, bør dog gjøres, og en fordel ved afbildning ved tegning er det ogsaa, at man herved kan samle billeder af en gjenstand fra forskjellige indstillinger og derved frembringe et helhedsindtryk, som det enkelte synsfelt ikke giver.

I denne henseende staar tegningen i modsætning til fotogrammet, der med nøiagtighed og finhed gjengiver, hvad der findes i det enkelte indstillede fokalplan, men uden at vælge og uden evne til at forfølge gjenstanden over i andre fokalplan.

Ved tegning efter mikroskopisk præparat begynder man med at afsætte de væsentligste træk og størrelsesforhold. Derefter indsættes omridsene af præparatets enkelte dele og tilslut de mindre detaljer.

Herved bør det strengt iagttages, at man ved gjengivelsen af de enkelte formelementer benytter en teknik, der ogsaa gjen-

Fig. 48.



Abbes tegneprisme. Zeiss Kahn.

giver detaljindtrykkene. Et jevnt finkornet protoplasma maa saaledes betegnes ved en fin punkteren, ikke ved skrafferen, selv om den maleriske effekt heraf vilde være bedre, osv.

Tegningen kan ofte lettes betydeligt ved forskjellige tegneapparater.

Det enkleste af disse er et i kvadrater inddelt okularmikrometer, der hjælper til bedømmelsen af størrelsesforholdene i synsfeltet.

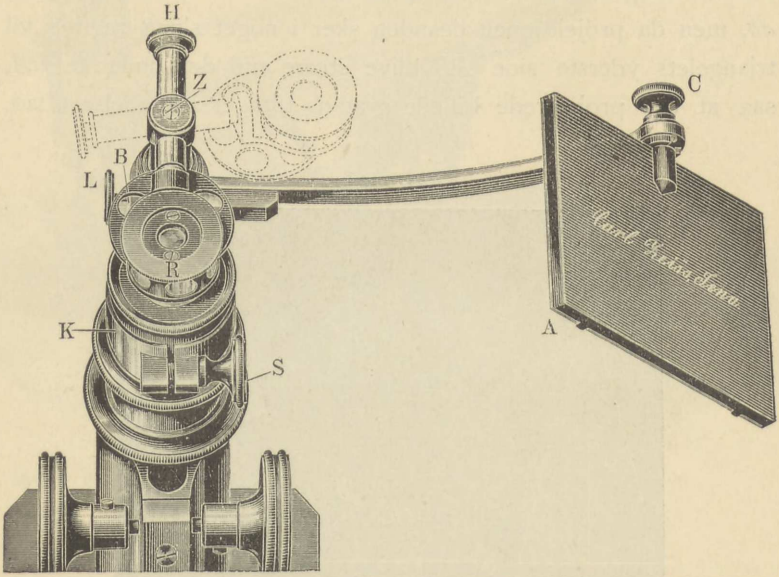
Ved de egentlige tegneapparater blir billedet ved hjælp af prismer eller speil projiceret ned ved siden af mikroskopet, hvor man da under øiets direkte ledelse kan optrække konturerne med blyant paa et stykke papir.

Omstaaende tegning af tegnespeilet viser dette i sin moderne skikkelse. Det er udstyret med charnièreled, saa det hurtig

kan slaaes tilside fra okularet, samt med røgglas til dæmpning af lyset.

Brugen af disse apparater fordrer dog nogen øvelse.

Fig. 49.



Abbes tegnespeil.

Følgende hensyn maa særlig iagttages:

1) Belysningen af synsfeltet og papiret maa være lige stærk, forat objektivbilledet og blyanten samtidig skal kunne sees skarpt. Oftest vil papiret vise sig stærkest belyst og maa derfor afdæmpes ved en skjærm, eller ved at der indsættes graa eller blaa glas foran prismet.

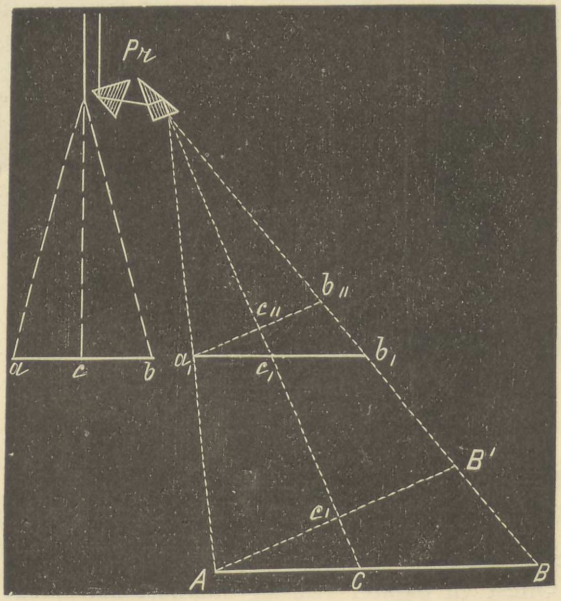
2) Papiret maa anbringes i billedafstand ɔ: ca. 250 mm. fra okularet, altsaa i høide med mikroskopets bord, ellers blir tegningen adskillig større end billedet paa grund af den større afstand, hvori det projiceres.

3) Underlaget maa desuden, særlig naar prismeapparat anvendes, skraane ind mod mikroskopet med en vinkel paa ca.

20°, da tegningen ellers blir fortrukket. Dette sees let ved betragtning af fig. 50.

Tegningen viser, hvorledes straalerne fra synsfeltet *acb* sendes gjennem prismet *P* ned paa arbeidsbordet til *ACB*. Da *PC* er længere end *Pc*, vil ogsaa billedet *AB* blive større end *ab*, men da projektionen desuden sker i noget skraa retning, vil triangelets yderste side *PB* blive større end dets inderste *PA*, saa at det projicerede billede gradvis tiltager i størrelse udad,

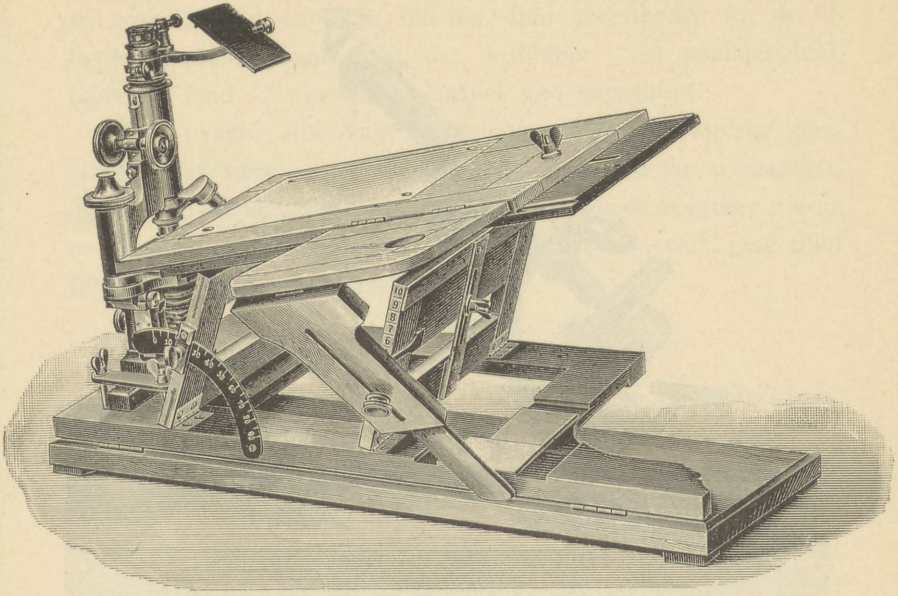
Fig. 50.



altsaa blir fortrukket. For at raade bod paa dette, maa projektionsplanet for det første løftes saa høit, at det kommer i høide med billedplanet, men dernæst ogsaa gives en saadan hældning, at $Pc = Pc_{,,}$, $Pb = Pb_{,,}$.

Hvor man har at udføre store tegninger, hvor denne fortrækning af billedet gjør sig mest gjældende, maa tegnepapiret derfor anbringes paa et ind mod mikroskopet skraanende under-

Fig. 51.



lag. Man har ogsaa særegne til dette formaal konstruerede tegneborde (f. eks. Giesenhagens, Bernhards tegnebord fig. 51), der letvindt lader sig stille i enhver høide og skraaning, der maatte udkræves.

Leitz har omgaaet denne fortrækning af billedet ved sit tegneokular med fast prisme (se fig. 52). Dette fæstes som et almindeligt okular i mikroskopets tubus og fæstes med en skrue, saa prismet vender ret bagud mod iagttageren. Mikroskopet bøies 45°, og synsfeltet projiceres ret ned, som fig. 53 viser, uden

Fig. 52.

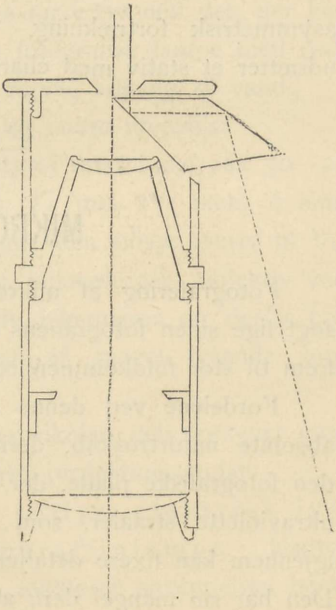
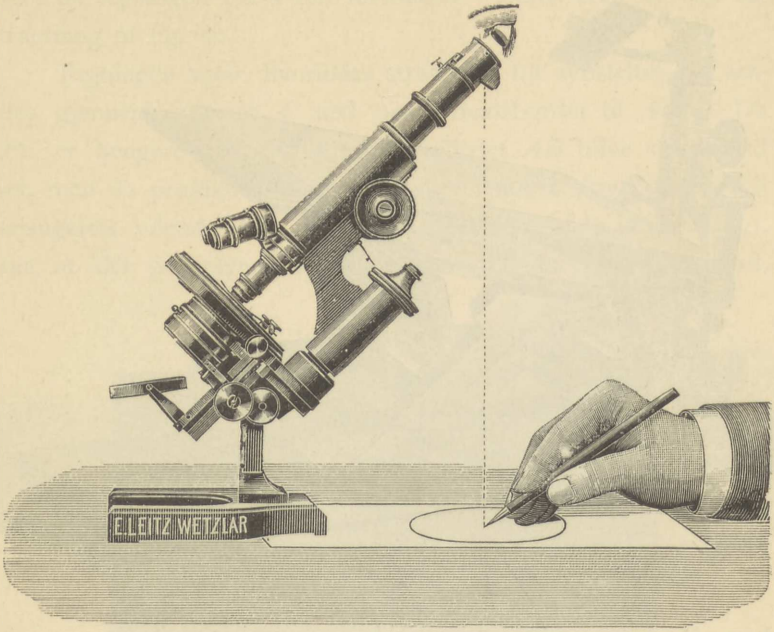


Fig. 53.



asymmetrisk fortrækning. Anvendelsen af dette prisme for udsætter et stativ med charnièreled.

MIKROFOTOGRAFI.

Fotografering af mikroskopiske gjenstande har været for søgt lige siden fotografiens opfindelse, og er efterhaanden drevet frem til stor fuldkommenhed.

Fordelene ved denne afbildningsmaade ligger først i dens absolute naturtroskab, dernæst ogsaa i den omstændighed, at den fotografiske plade, der er mest ømfindtlig for violette og ultraviolette straaler, som øiet lidet eller ikke opfatter, herigjennem kan fixere detaljer, der ellers unddrager sig iagttagelse. Den har sin mangel deri, at fotografiet kun gjengiver, hvad der

ligger i det engang indstillede fokalplan, uden at man, som ved en tegning, kan supplere billedet med enkeltheder fra de tilliggende planer, samt i at det, kritikløst i sin paalidelighed, tager alt med — uvæsentligt saavel som væsentligt.

For uvante øine kan fotogrammer af mikroskopiske gjenstande ofte være noget vanskelige at tyde, da farver mangler, og de ved tegningerne ofte kunstigt forstærkede konturer gjerne er mere forviskede. Men en smule øvelse vil snart give tillid til denne afbildningsmaade.

Til mikroskopisk fotografering udkræves:

1. mørkekammer med apparater og kemikalier til fremkaldelse, fixering og kopiering af pladen;
2. et godt mikroskop med lampe og belysningsapparater;
3. mikrofotografisk kamera.

Til mørkekammer kan anvendes et hvilketsomhelst lidet kot, hvorfra lyset fuldstændig kan udelukkes. Vinduet blændes ved tætsluttende gul-røde skjærme, der tilbageholder de kemiske (violette) straaler. Trænges mere lys end det, der kan passere denne skjærm, anvendes en fotografisk lampe med rødt glas. I mørkekammeret maa være rigelig adgang til vand.

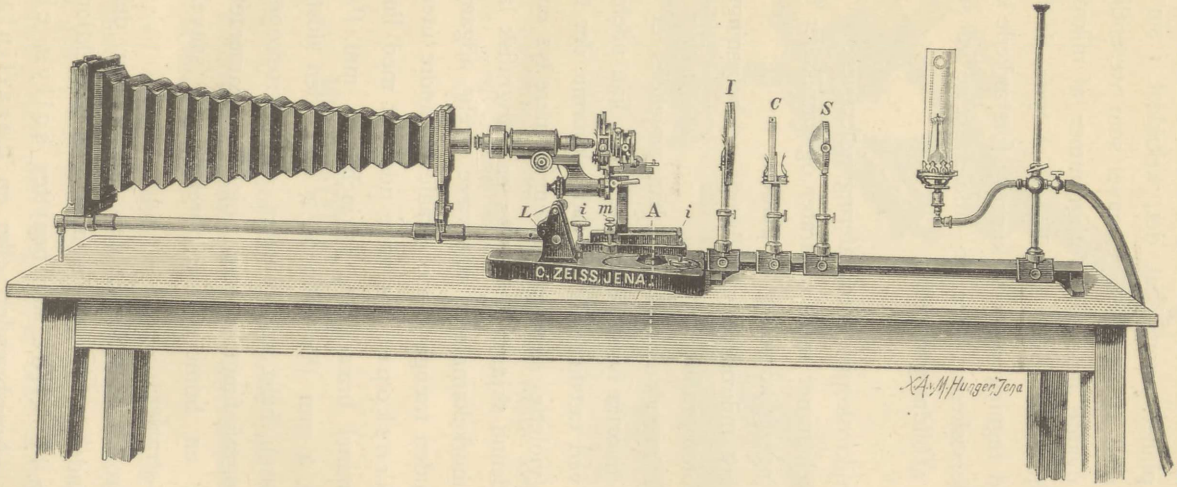
Desuden trænges endel skaale og andre utensilier.

Mikroskopet bør være udstyret med linser paa 30—25 mm. nominel brændvidde (1 inch), 12 mm. (1/2 inch), 6 mm. (1/4 inch), 4 mm. (1/6 inch) og 2 mm. (den sidste svarer til 1/12 hom. imm.), helst apokromater, da mikroskopets objektiv ved mikrofotografi fungerer som objektiv i kameraet og derfor bør præstere en homocentrisk forening af saavel lysende som kemiske straaler.

Mikroskopet anvendes dels uden okular, dels forsynet med det almindelige Huygenske, helst med projektionsokular.

Som lyskilde kan benyttes sollys, elektrisk lys, gaslys (Auer-brænder) eller en paraffinlampe. Uagtet sollys selvfølgelig er det kraftigste, medfører anvendelsen heraf

Fig. 54.



dog mange vanskeligheder. Solens skiftende stilling kræver ved længere tids arbeide benyttelsen af et saa kompliceret og kostbart instrument som en heliostat, ligesom der baade for at tilbageholde de saavel for præparat som objektiv skadelige varmestraaler, for at skaane øiet under indstillingen og særlig for de almindelige akromatiske linser at frembringe et monokromatisk lys maa anbringes et lysfilter foran mikroskopet. Dette lysfilter bestaar af 1 eller 2, af planparallele glasplader lavede flade beholdere, som fyldes med en tynd kobberammoniakopløsning. Det igjennem disse faldende blaa lys er særlig skikket for fotografisk arbeide.

Dersom lampelys anvendes, sendes dette først gjennem en stærk plankonvex linse i en parallel straalebundt mod mikroskopets kondensor (til fotografisk brug anvendes akromatisk kondensor).

Kameraet kan gives forskjellige konstruktioner. Til almindeligt brug, hvor ikke de subtileste resultater søges opnaaet, kan man godt klare sig med de af Zeiss, Leitz o. fl. fabrikerede smaa kameraer, der dels kan have en vertikal dels horizontal stilling. (Fig. 54 og 55). Ved de sidste maa mikroskopet bøies om, hvad der kan have sine ulemper, naar objektet ligger i et flydende medium, eller naar der benyttes immersionslinser.

Mikroskopet og kamera forbindes lystæt ved en manschet af metal eller tøi.

Van Heurck anvender ved mikrofotografi med udmærket resultat et ganske simpelt kamera, bestaaende af et slags skab paa 4 ben. Gjennem et hul i bunden stikkes mikroskopets øverste del ind, skabets ene side kan lukkes op som en dør, og der er rigelig plads til at stikke hovedet ind og foretage en nøiagtig indstilling af mikroskopet. De af v. Heurck leverede fotografier af meget delikate gjenstande, især diatomeer, hører til de mest fremragende præstationer paa dette omraade.

Det præparat, som skal fotograferes, maa i enhver henseende være udadleligt. Tyndt snit, distinkt og hensigtsmæssig

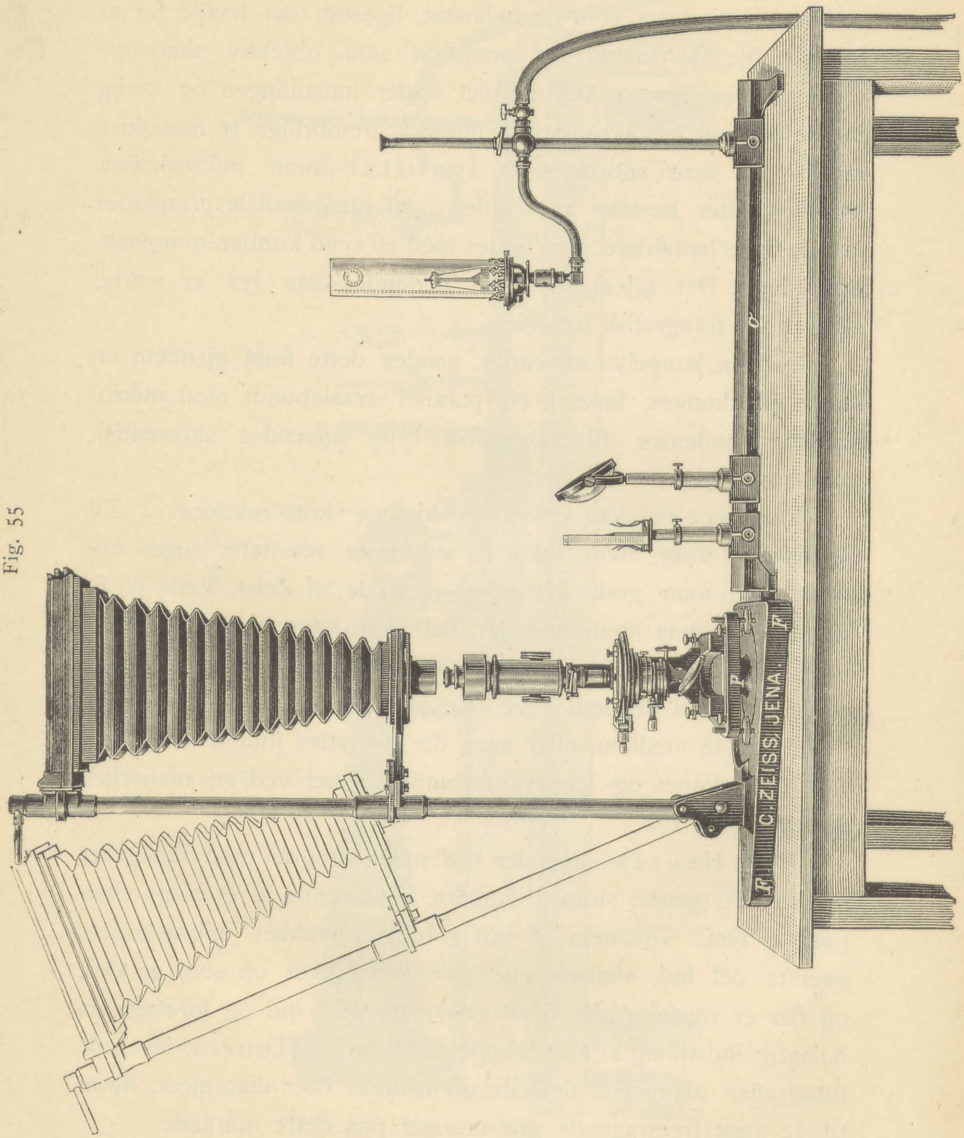


Fig. 55

farvning samt fuldkommen plan udbredning paa objektglasset er elementære fordringer.

Ved bakteriepræparater viser vesuvinfarvning sig meget hensigtsmæssig. Den almindelige (røde) fuchsinfarvning giver mindre tilfredsstillende billeder, men ved anvendelse af grønlige lysfiltre kan man ogsaa her faa meget skarpe billeder.

Præparatet indstilles først nøie paa almindelig vis. Okularet tages bort, om man ønsker at fotografere uden dette, eller erstattes af projektionsokular. Derefter forbindes mikroskopet og kameraet.

Lyset bringes dernæst til at falde jevnt og kraftigt over hele synsfeltet. Ved stærke forstørrelser bør billedet af lyskilden bringes til at falde sammen med objektbilledet, ved lavere forstørrelser bruges konvergent lys, saa at lyskildens billede falder ovenfor objektivlinserne.

Det fremkomne billede undersøges nu med hensyn paa totalvirkning paa kameraets bagerste matte glasplade; det bør ligge midt paa denne. Ved at forlænge eller forkorte kameraet finder man samtidig den mest passende størrelse for billedet. Nu ombyttes den matte plade med en af gjennemsigtigt glas, hvorpaa billedet i sine enkeltheder undersøges ved hjælp af en lupe, ligesom den endelige skarpe indstilling foretages.

Er denne bragt i orden, byttes glaspladen med kasetten, som indeholder den fotografiske plade (indlagt i mørkekammeret), skjærmen trækkes fra, og exponeringen begynder.

Efter lysets, præparatets og pladens beskaffenhed bliver expositionstiden temmelig varierende, fra $^1/_2$—$^3/_4$ op til flere minuter. Vistnok gives der lysmaalere, som angiver den expositionstid, der udkræves ved en bestemt lysstyrke, men den personlige øvelse og erfaring spiller dog her den vigtigste rolle.

De almindeligst brugte plader er Ilford, Imperial Lumière, Proces osv.

Til farvede præparater, særlig bakterier, bruges bedst isokromatiske plader. v. Heurck anbefaler særlig Carbutts ortokromatiske og Vogel-Obernetters eosinplader.

Ved pladernes senere behandling — fremkaldelsen og fixeringen samt kopieringen paa fotografisk papir — kan man gaa frem paa mangfoldige maader.

Det følgende er en gjengivelse af de af van Heurch anbefalede, gjennem mange aar anvendte og af de allersmukkeste resultater kronede methoder, som de er fremstillet i hans «Le microscope».

Fremkaldelsen. Pladen udtages af kasetten i mørkekammeret og lægges straks ned i en firkantet glas- eller koutschoukskaal, indeholdende fremkaldelsesvædsken, eller den overhældes hermed. Vædsken maa holdes i stadig bevægelse over pladen.

Hvis man foretrækker at hælde fremkaldelsesvædsken ud over pladen, bør denne først fugtes i vand, for at vædsken skal flyde ligeligt udover; ellers blir billedet flækket.

Der er en talrig mængde fremkaldelsesvædsker: jern, pyrogallussyre, hydroquinon, eikonogen (endvidere metol, paramidophenol, rodinol, amidol og glycin) — med alle kan opnaaes gode resultater, naar blot expositionstiden er valgt tilsvarende rigtigt.

Van Heurck bruger altid «P. Merciers perfect Hydroquinone and eosin developer» eller ogsaa følgende formel:

Hydroquinon	8,00
Natriumsulphit	50,00
Natriumcarbonat	50,00
Bromkalium	1,00
Eosin	0,01
Vand	1000,00

eller til meget fine objekter — da hydroquinonet paa sensitive plader fremkalder et noget grovkornet billede, følgende:

Eikonogen	3,50
Carbon. natr. pur.	2,50
Sulphat. natr. par.	3,50
Vand	100,00.

Har expositionen været rigtig, vil billedet begynde at vise sig, naar fremkaldelsesvædsken har virket ca. 3 minuter. Den hele fremkaldelsesproces vil medtage 10 til 15 minuter, og billedet vil da mod lyset kunne sees klart i alle detaljer. Hvis expositionen har været utilstrækkelig, pladen mindre følsom end normalt eller fremkaldelsesbadet paa grund af foregaaende brug for svagt, vil billedet først træde frem noget senere og tage længere tid til fuld udvikling; man bør da ogsaa skifte fremkaldelsesbadet endog flere gange. Denne methode giver ogsaa udmærkede resultater ved moment-plader.

Ved overexponerede plader begynder billedet at vise sig før 3 minuters forløb. Ved anvendelsen af Merciers «perfect developer» kan pladen dog reddes ved at man fortynder badet med vand, saa at fremkaldelsen foregaar langsomt.

Ti—tolv plader kan fremkaldes i det samme bad, men for de sidste maa man da regne 4 minuter, før der sees virkning. Ved tilsætning af frisk vædske kan virkningen forstærkes.

Naar fremkaldelsen er færdig, vaskes pladen omhyggeligt i rindende vand og fixeres derpaa.

Til fixation benytter v. Heurck en 20 % vandig opløsning af natriumhyposulfit, der altid maa bruges frisk og i saapas stor mængde, at pladen er fuldt dækket af vædsken. Saafremt vædsken blir brun, slaaes den bort. Fixationen er færdig, naar der ikke længere sees nogen hvide flækker paa pladens underside.

Pladen vaskes da godt paany og hærdes nogle minuter i en mættet alunopløsning, hvorpaa den sidste udvaskning foregaar ved at hensætte pladen 10—12 timer i rigeligt (eller rindende) vand, hvorefter den tørres i luften i stuetemperatur.

Kopieringen af negativet paa fotografisk papir er en noksaa ligetil proces. Den kan hensigtsmæssigst overlades til en fagmæssig fotograf, som paa forhaand dog maa gjøres opmærksom paa billedets væsentlige træk.

Man anvender for tiden ett positivpapir (lysømfindtligt klorsølvpapir) af de mange sorter, som gaar i handelen.

Det udtages af indpakningen i mørkekammeret — absolut mørke unødigt, rødt lys taales — og lægges i kopierrammen mod den tørrede negativplade, saaledes at hinde ligger mod hinde. Udsættes dernæst for diffust dagslys i et tidsrum, der efter lysets styrke og pladens tæthed kan variere noget; normalt vil ca. 20 min. være nok, men ved daarligt vinterlys og tætte plader kan der trænges flere timer.

Kopien kontrolleres ved at aabne kopierrammens bagerste væg et lidet øieblik. Det bør, før kopieringen afsluttes, vise sig noget mørkere, end man ønsker billedet, da det afbleges noget under den senere behandling (tørring og fixering).

Den færdige kopi tones i et guldbad, der for de forskjellige papirer har noget vekslende sammensætning, som gjerne angives udenpaa papirets emballage. I toningsvædsken forbliver papiret, indtil det har faaet en passende farvetone, i regelen omtr. 5—6 minuter.

Dernæst fixeres det i 1—10 % opløsning af natriumsulphit i 5—10 minuter, udvaskes saa grundigt i vand gjennem flere timer, lufttørres og opklæbes paa carton.

Fra ovenstaaende angivelser er der en masse afvigelser, saavel i valg af plader som af de forskjellige bad. Det gjælder at erhverve sig saa megen øvelse, at man behersker en methode fuldstændig og kan variere den rigtigt efter de forskjellige øieblikkets krav.

Forøvrigt henvises til de mikrofotografiske fagbøger.

ANDET AFSNIT.

UNDERSØGELSESMETHODER.

Almindelige bemærkninger.

Den gjenstand, som skal undersøges, anbringes paa en liden glasplade, objektglasset, og dækkes, for at beskytte den og for at frembringe en plan overflade, af en anden, ganske tynd glasplade, dækglasset.

Objektglassene kan selvfølgelig være af forskjellig form og størrelse, men oftest bruges nu det engelske format (75 × 25 millimeter); i Tyskland anvendes dog ogsaa det saakaldte «Giessener Vereinsformat» (48 × 28 mm.), og flere af de store laboratorier har sine egne størrelser.

Dækglassene er oftest kvadratiske med 18 mm.s side, men ogsaa større og mindre. Men baade størrelse og form varieres efter behov.

Dækglassets tykkelse varierer i regelen mellem 0,10—0,20 mm. Tyndere dækglas gaar altfor let i stykker, tykkere vil ved stærke linser med kort arbeids afstand endog vanskeliggjøre indstillingen. Ved stærkere linser, der er korrigerede til bestemt dækglastykkelse (se side 37), maa selvfølgelig denne anvendes. I regelen benyttes dækglas af 0,15—0,17 mm. tykkelse.

Til at maale dækglastykkelsen gives der forskjellige apparater.

Som omtalt side 58 kan dækglastykkelsen ogsaa tilnærmelsesvis findes ved indstillingsforandringer af mikroskopet.

Objekt- og dækglas maa før brugen være nøiagtigt rengjort. De pudses bedst med et blødt lærredsstykke, et udtjent lommetørklæde er meget hensigtsmæssigt.

Brugte objekt- og dækglas renses, naar de har været anvendt til glycerinpræparater eller med vandige opløs-

ninger, ved at henlægges en dags tid i sæbevand og derefter grundig afskylles i rent vand eller tynd alkohol samt aftørres.

Kanadabalsam kan fjernes ved at glassene lægges i stærkt varmt grønsæbevand i 24 timer, derefter afvaskes i alkohol (50 %), vand og aftørres.

Fol anbefaler at lægge saadanne objekt- og dækglas en længere tid i fortyndet salpetersyre, derefter afskylling i vand eller alkohol.

Alle glassager kan renses i Gages vaskevand:

Stærk svovlsyre	1,0
Bichrom. kal.	1,0
Vand	100,0.

Præparatets behandling.

Vædsker, der indeholder svævende smaadele, undersøges, idet en draabe deraf ganske enkelt med en pipette overføres paa objektglasset.

Dækglas kan i visse tilfælde med fordel undlades, nemlig hvor man med vandimmersionslinse iagttager smaalegemer i vand eller andre for objektivet uskadelige medier af samme brydningsevne. Zeiss har konstrueret objektivsystemer for vandimmersion med stor brændvidde netop for undersøgelse af større gjenstande under vand.

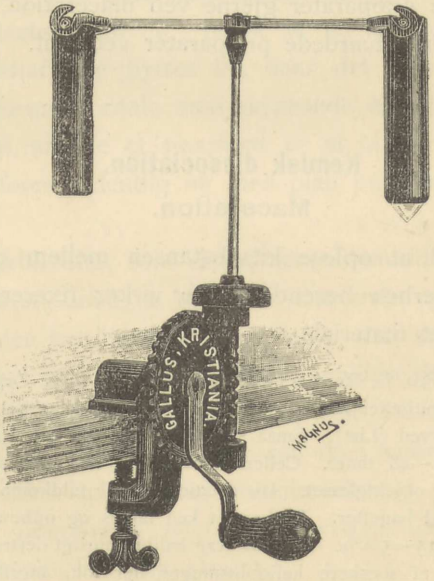
Bundfald ophentes til mikroskopisk brug med en, helst lidt fin, pipette. Da bundfaldet kan være afsat lagvis efter de forskjellige bestanddeles specifike vægt, kan man stundom være nødt til at tage prøver fra forskjellige dybder. Man bør huske paa, at det bundfald, der ligger dybest i glasset, ved vædskesøilens tryk kommer først ind i pipetten og høiest op i denne, men sidst ud igjen, naar indholdet tømmes draabevis paa objektglas. Man bør derfor som regel gjøre færdig en række saadanne (6—8) for at faa pipetten ganske tom.

Draaberne maa være af passelig størrelse; for store flyder de udenfor dækglasset, og ved borttørren med filtrerpapir følger størstedelen af de korpuskulære elementer med, da disse netop mest samles langs dækglassets rande. For smaa draaber, der ikke fylder hele rummet under dækglasset, tillader at dette med sin vægt trykker de fine og skrøbelige mikroskopiske elementer. Ved meget skrøbelige gjenstande kan dækglasset lægges paa voksfødder, (smaa voksdraaber i hjørnerne).

Hvor de korpuskulære elementer er meget rigelige (pus, blod osv.), bør stoffet fortyndes med en indifferent eller fixerende vædske.

Istedetfor bundfældning, der tager tid, anvendes nu gjerne centrifugeren, der er indført af Stenbäck. Centrifugeren i 3—4 minuter udretter det samme som 24 timers henstand. Der gives flere slags centrifuger til mikroskopisk brug. De fleste er dog store og kostbare. Kreftings praktiske og billige centrifuge er i grunden den bedste. (Fig. 56).

Fig. 56.



Det er hensigtsmæssigt at lade de færdige præparater ligge et øieblik før undersøgelsen, for at bundfaldet kan sænke sig ned paa objektglasset. Smaadelene kommer da at ligge i et og samme plan, hvorved undersøgelsen lettes.

For at undgaa fordampningen af vædsken under en længere undersøgelse giver man dækglasset en kant af voks, kanadabalsam, maskelak e. l.

Isolering af vævets enkelte smaadele, dissociering. — Maceration, pillen, pensling, rysten.

Faste væv kan kun i sjeldne tilfælde med en gang og uden nogen behandling lægges under mikroskopet (oment, svømmehinde hos frosk, fine membraner osv.).

Skal man studere de enkelte vævsdele for sig, maa disse med forskjellige midler — kemisk eller mekanisk — skilles fra hinanden, friske præparater gjerne ved maceration, pillen, pensling eller rystning, hærdede præparater ved snit.

Kemisk dissociation.

Maceration.

Virker ved at opløse kitsubstansen mellem cellerne. De fleste af de herhen hørende stoffe virker fixerende. Kræver friskt, uforandret materiale.

a) Alkohol 30 %, Ranviers alkohol, alcool au tiers, Drittelalkohol.

Dissocierer epithelier meget godt, bedst dog pladeepithel, cylinderepithel svulmer lidt op herved (List). Smaa stykker, ikke over 0,5 kubikcentimeter, i sparsom vædske 24—48 timer. Cellerne løsner da let, naar stykket med pincetten stødes mod objektglasset. Dissociationen blir fuldkomnere ved at ryste præparatet i alkohol bagefter. Præparatet kan farves og opbevares.

b) Kalilud 35—50 %. Medens svag kalilud hurtigt destruerer vævet, forandres dette lidet af stærkere kaliopløsninger, der kun angriber kit og sub-

stansen. Isolerer glatte og tværstribede muskelceller. Smaa stykker 15—30 minuters indvirkning. Undersøges i samme vædske. Dissociationen fuldendes ved at ryste præparatet. Tilsætninger, hvorved kaliluden fortyndes, bevirker øieblikkelig ødelæggelse af præparatet.

Kun ved haar, negle, epidermis kan noget tyndere opløsninger anvendes.

c) Saltvand 10 % (klornatrium) egner sig godt til isolation af epithelier. Indvirkningstid 12—24 timer.

d) Salpetersyre 20 % isolerer friske muskelfibre i 24 timer.

e) Saltsyre, koncentreret eller 20 % til isolation af kjærtelorganer, især nyre. Opløser bindevævet mellem kjærtelgangene, saa disse blir frie.

Smaastykker af frisk nyre lægges ca. 2 timer i konc., 6—8 timer i 20 % opløsning. Rystes, ikke for stærkt.

f) Kromsyre 0,1—0,02 % anvendes til at isolere friskt nervevæv, især de store ganglieceller.

Smaa stykker, 10—15 ctm. vædske, 24 timers indvirkning eller mere.

g) Pikrinsyre, mættet vandig opløsning, isolerer bindevævsfibreller i sener og fascier. Maanedlang indvirkning.

h) Osmiumsyre 0,10 % til cylinderepithelier 24 timer, retina, ganglieceller.

i) Formol 1 % isolerer kjærtler i 12—24 timer.

Mekanisk dissociation anvendes dels alene, dels efter maceration; baade til frisk og hærdet væv.

a) Pillen bruges især ved fibrillær-strukturer. Udføres med to naale, som maa være spidse og glatte (rustne, bøiede, sløve eller tilsølede dur ei). Bedst er en almindelig synaal no. 4 i et hækleskaft, de byttes let, naar det behøves. Stundom bruges spydformede naale med skjærende eg.

Rigtig at udpille et præparat er et taalmodighedsarbeide, som maa udføres ordentlig og med plan, om det skal give godt resultat.

Ved fiberbundter, som sener, nerver, muskler osv. bør den hele bundt først kløves i to i den ene ende og delene bredes ud fra hinanden her, medens man lader den anden ende i sin sammenhæng. Hver af de isolerede bundter deles paa nyt og videre paa samme maade, indtil den hele bundt er vifteformig udbredt paa objektglasset. Man ser da i samme præparat de enkelte elementer isolerede og i sammenhæng. Arbeidet lettes ofte ved at præparatet pilles halvtørt, idet de isolerede fibriller da holdes fast paa glasset.

b) Pensling bruges især i snitpræparater til at fjerne enkelte løsere dele, saa grundsubstansen skal blive mere fremtrædende (retiklet i lymfeknuder). Udføres med en tvært afklippet haarpensel, der med lette slag duttes ned paa præparatet; dette bør ligge i rigelig vædske.

c) Rystning udretter det samme som pensling. Bruges desuden for at fuldende dissociationen ved macererede præparater.

Et reagensrør fyldes halvt med vand, alkohol eller anden vædske og rystes, til vævselementerne danner en jevn blakning af vædsken. Forhornede epithelier og muskelceller taaler temmelig stærk rystning, andre epithelier og kjærtelgange maa behandles med større forsigtighed.

Begyndere forsøger ofte at isolere vævselementerne ved at trykke paa dækglasset. Dette er med ganske faa undtagelser absolut forkasteligt, i de allerfleste tilfælde ødelægges præparatet derved, idet de lidet modstandsdygtige elementer presses sammen til en ganske ukjendelig masse.

Undersøgelsesvædsker.

Friske vævsdele, der ønskes iagttagne uforandrede, anbringes ved undersøgelsen i et saavidt muligt indifferent, neutralt, medium under dækglasset.

Indifferente undersøgelsesvædsker.

1. Naturligt serum er det mindst angribende for frisk væv. Man kan benytte friskt blodserum, kammervand, filtreret vædske fra serøse betændelser eller ogsaa almindelig hønseæghvide.

Naturligt serum er dog vanskeligt at faa fat paa og kan ikke opbevares.

2. Iodserum (Max Schulze) bestaar af frisk amniosvædske eller andet serum, hvortil sættes saa meget iodtinktur,

at vædsken blir tydelig gul. Naar farven efter nogen tid er afbleget, maa ny iodtinktur tilsættes.

Heller ikke iodserum er meget holdbar.

3. Kunstigt iodserum (Frey).

Æghvide	30,00
Klornatrium	0,40
Vand	270,00
Iodtinktur	6,00,

som konserveringsmiddel.

4. I almindelighed kan man længe nøie sig med

Saltvand 0,6—0,75 %, fysiologisk saltopløsning, der er den hyppigst anvendte undersøgelsesvædske ved friske præparater.

Almindeligt rent vand, destilleret vand, er derimod ikke indifferent ligeoverfor friskt væv, hvis elementer det bringer til at svulme op.

Ofte ønsker man at fremkalde visse forandringer i præparatet; man anvender da de

Differente undersøgelsesvædsker.

1. Glycerin er af disse det mindst energiske og mest anvendte. Bruges til at opklare præparaterne. Anvendes især ved hærdede præparater. Den opklarende virkning optræder i sin fulde udstrækning ofte først efter flere timer. Friske præparater, der undersøges i glycerin, vil paa grund af vædskens hygroskopiske egenskaber vise lette skrumpningsfænomener, hvorhos finere vædskedetaljer blir utydelige paa grund af glycerinens forholdsvis stærke lysbrydningsevne ($n = 1,47$).

Glycerin bør ikke bruges ved anilinfarvede præparater, da disse farver som oftest opløses og udtrækkes i glycerin, især naar den ikke er syrefri.

2. Glycerinvand.

Glycerin pur. } lige dele.
Destilleret vand }

Virker ikke hygroskopisk og har svagere lysbrydningsevne ($n = 1{,}39$) end ren glycerin. Passer derfor bedre til undersøgelse af friske objekter. Præparaterne holder sig dog ikke saa godt heri.

3. Glycerinalkohol, Calberlas vædske.

Glycerin }
Vand } lige dele.
Alkohol }

Egner sig godt, hvor man ønsker gradvis at overføre fine objekter i stærkere glycerin. Præparatet dækkes med dækglas, men fra kanterne foregaar en stadig fordampning af alkoholen og vandet, saa vædsken tilslut væsentlig indeholder glycerin.

4. Eddiksur kali

i mættet opløsning anvendes til friskt væv, den har mindre stærk lysbrydning end glycerin ($n = 1{,}37$), og taales bedre af det friske væv end denne. Egner sig især til undersøgelse af fedt (fedtdegeneration). Til anilinfarvede præparater anvendes 50 % opløsning.

Præparaterne kan opbevares.

5. Methylalkohol,

mindre lysbrydende end vand ($n = 1{,}32$) bruges, hvor der tiltrænges et medium af saadan beskaffenhed.

Præparatet kan kun opbevares, naar dækglasset tilkittes forsvarlig.

6. Eddiksyre 0,2—2,0 %. Bringer almindeligt celleprotoplasma og bindevævsfibre til at svelle ud og forsvinde for iagttageren. Cellekjerner skrumper lidt og faar skarpere omrids. Elastiske fibre, bakterier angribes ikke.

Tjener til at opklare præparatet og bringe frem cellekjerner, elastiske fibre (bakterier).

7. Myresyre 0,2—2 % som eddiksyre.

8. Baade eddiksyre og myresyre bruges ofte sammen med glycerin som eddiksyreglycerin eller myresyreglycerin, begge 1—2 %, hvor stærk og hurtig opklaring ønskes.

9. Kalilud 1—2 % destruerer hurtigt de fleste vævsdele; modstaaes kun delvis af forhornede epithelier, fedt, elastisk substans og mikroorganismer. Bruges til at paavise disse. Præparatet kan ikke opbevares. Objektivlinsen maa ikke tilsøles med reagenset.

Angaaende Pacinis, Hayems undersøgelsesvædske til blod, se fixeringsmidler (side 86).

Anm. I praksis vil man ikke sjelden finde det hensigtsmæssigt at undersøge et præparat først i en, dernæst i en anden undersøgelsesvædske. Vædsken kan skiftes uden at dækglasset fjernes, idet det første medium trækkes bort med et stykke filtrerpapir, medens det andet tilsættes ved dækglassets modsatte rand. Det maa erindres, at det dog tager lang tid at faa hele præparatet gjennemtrængt med reagenset paa denne maade.

Fixering og hærdning.

Kun et forholdsvis ringe antal undersøgelser vil dog udføres paa friskt væv. I regelen maa gjenstanden gjøres skikket til den mikroskopiske undersøgelse gjennem en række processer, der gaar ud paa at fixere vævet i dets naturlige skikkelse og give det en konsistens, saa deraf kan forfærdiges de tynde mikroskopiske snit, der endelig gjerne farves paa forskjellig vis.

Fixering er den proces, hvorved det friske, levende væv ved fysiske eller kemiske midler hurtigt fæstnes i saavidt mulig livslignende skikkelse.

Hærdning er den proces, hvorved det friske, i regelen bløde væv ved kemiske midler meddeles en fast, snitbar konsistens.

Begge processer beror paa, at vedkommende agenser enten extraherer det i vævet indeholdte vand, eller coagulerer albuminater, muciner osv. eller indgaar kemiske forbindelser med vævsdelene. Begge processer er saaledes beslægtede, de fremkaldes for en stor del ogsaa ved de samme midler, om end ved noget

forskjellig anvendelse af disse, og de kan ofte iværksættes samtidig, hvorfor man ogsaa ofte om end med urette opfatter dem som identiske.

Fixeringen maa nødvendigvis foregaa hurtigt, saa vævet ikke faar tid til at undergaa nogen som helst morfologisk forandring; hærdningen kan gjerne strække sig gjennem længere tid.

En anden sag er det, at man ved objekter, der ikke skal undersøges paa vævets fineste enkeltheder, ikke udfører fixeringen som egen proces, men nøier sig med den ogsaa ved hærdningen optrædende mindre fuldkomne, men til almindelig brug fuldt tilstrækkelige fixering.

Fixering.

Almindelige betingelser for god fixering er:

Friskt, uforandret væv — smaa vævstykker ikke over ctm. — rigelig mængde af fixationsmidlet — ikke længere indvirkning af dette end netop nødvendig — og endelig for de mineralske syrer og salte: grundig udvaskning efter fixeringen, da farvningen ellers blir vanskelig.

Som fixeringsmidler anvendes varme (kogning), forskjellige mineralske og organiske syrer og salte (især klorider) samt alkohol.

Det vil ofte vise sig hensigtsmæssigt at fylde det glas, hvori fixationen skal foregaa, $^2/_3$ med bomuld eller opkrøllet filtrerpapir. Vævstykkerne undgaar da paa det bløde underlag den fladtrykning ved egen vægt, som man vanlig finder, naar de ligger direkte paa glassets bund. I tilfælde af, at alkohol benyttes, vil stykket desuden ogsaa komme til at blive liggende i vædskens øverste ɔ: alkoholrigeste region, idet det af vævet udtrukne vand synker til bunds. Paa bunden findes derfor den mest fortyndede alkohol.

Af de mangfoldige fixationsmidler skal her kun nævnes et mindre antal.

1. Osmiumsyre OsO_4, overosmiumsyre, osmiumtetroxyd (Max Schultze 1865), hvidlige krystaller, der fordamper i luften. Dampene irriterer øiets og respirationsorganernes slimhinder. Opbevares paa tilsmeltede glas.

Opløsninger tillaves af destilleret vand, maa holdes paa mørke, med glasprop godt lukkede flasker, da osmiumsyren let reduceres af organiske bestanddele (støv) og af lyset.

Da *Os* udfældes paa metalinstrumenter, bør man under arbeide hermed bruge naale af glas, træ eller ben.

Osmiumsyren virker, idet den reduceres af vævene, som derved farves mørke (sorte) ved udfældt metallisk osmium, eller idet syren med vævet indgaar en kemisk forbindelse.

Fedt, myelinet i nerverne og garvesyre farves særlig intenst, fornemmelig ved efterfølgende alkoholhærdning.

Osmiumsyren er et af vore bedste og paalideligste fixationsmidler.

Anvendes dels i dampform, dels i vandige opløsninger baade alene og sammen med andre fixeringsmedier, især kromsyre og eddiksyre.

Osmiumsyredamp.

Ganske smaa objekter (enkle løsrevne celler, infusorier o. l.) fixeres i løbet af $^1/_2$—1 minut i en draabe saltvand paa et objektglas, som holdes nedadvendt over aabningen af en flaske, hvori en osmiumsyreopløsning 1 %.

Stykker paa 2—3 mm. tykkelse ophænges i en traad eller udspændes (helst med pindsvinpigger, berberisnaale eller andre ikke-metalliske gjenstande) under korken i en bredhalset krukke, paa hvis bund der er en liden mængde osmiumsyre 1 %. Fixeringen ansees for færdig, naar stykket viser sig let brunet; for større stykkers vedkommende er 1 times behandling i osmiumsyredamp nok. Efter dampningen lægges stykkerne gjerne en stund ned i vædsken.

Bagefter udvaskning i 1—3 timer i rigeligt (helst rindende) vand, efterhærdning i stærk alkohol.

Osmiumsyreopløsning anvendes til fixation gjerne i en styrke af 1 %, dog varieres fra 0,05—2 % efter gjenstandens natur.

Stykkerne bør være smaa, ikke over 0,5 ctm. i tværmaal; forbliver $^1/_2$—24 timer i vædsken efter stykkets beskaffenhed. Udvaskning i rindende vand, efterhærdning i alkohol 90 %.

Fixering med Os-damp har den fordel, at objekterne meget hurtigere gjennemtrænges, og derfor fixeres nøiagtigere end ved opløsningerne. Dampfixerede

objekter tiltrænger ogsaa kortere udvaskning. Det længere ophold i osmiumsyreopløsningen bevirker, at de yderste partier af præparaterne let blir haarde og sprøde.

Alle fixeringer med osmiumsyre bør udføres i mørke, udvaskningen udføres omhyggeligt. Ved overfixering kan udvaskningen hensigtsmæssigt ske med Müllers vædske (se side 89), hvorefter præparaterne ogsaa blir lettere at farve i carmin og hæmatoxylin.

Kromsyre anvendes til fixering i vandige opløsninger fra 0,1—1,0 %, der indvirker fra 6—24 timer eller flere dage. Kromsyren indgaar en kemisk forbindelse med vævet, «garver» det, saa det kun ufuldkomment atter kan udvaskes. Præparaterne maa under alle omstændigheder udvaskes overmaade grundigt, helst i rindende vand (under springet) i 24—48 timer.

Efterhærdning med alkohol maa foregaa i mørke, da alkoholen med kromsyren (eller dens salte) ellers danner forstyrrende nedslag og grumsning.

Præparater, der efter behandling med kromsyre og dens salte lægges i alkohol, antager en karakteristisk skiddengrøn farve.

Farvninger blir i regelen mindre gode efter kromsyre, bedst farver her hæmatoxylin, dernæst fuchsin, safranin o. fl. aniliner.

Kromsyren bruges sjelden alene, oftest i forbindelse med Os eller Ā. hvorved ulemperne blir mindre fremtrædende.

Stærk krom-osmium-eddiksyreopløsning (Flemmings vædske)

Osmiumsyre	0,10	eller lavet af de almindelige færdige opløsninger	Osmiumsyre	1 %	— 10 vol
Kromsyre	0,25		Kromsyre	1 %	— 25 vol
Iseddike	0,10		Eddiksyre	1 %	— 10 vol
Vand	100,00		Vand		55 vol

Svagere krom-osmium-eddiksyreopløsning (Fol's vædske).

Osmiumsyre	0,02	eller	Osmiumsyre	1 %	— 2 vol
Kromsyre	0,25		Kromsyre	1 %	— 25 vol
Eddiksyre	0,10		Eddiksyre	1 %	— 10 vol
Vand	100,00		Vand		68 vol

Den tilsatte eddiksyre bevirker, at den hele vædske trænger hurtigere ind, samt er af betydning for fixation af kjærnens nuclein, der ellers er opløselig i frie mineralsyrer.

Begge fortræffelige fixationsmidler for kjærnestrukturer.

Præparaterne i regelen fuldt fixerede efter 24 timer, kan dog uden væsentlig skade ligge i ugevis. Maa udvaskes godt i vand. Farves mindre godt i carmin. Udvaskning og farvning lettest ved Fol's vædske.

Der gives forøvrigt talrige blandingsvariationer af denne krom-osmium-eddiksyre.

Krom-eddiksyre (Flemming)

Kromsyre	0,25	eller	Kromsyre	1 %	— 25 vol
Eddiksyre	0,10		Eddiksyre	1 %	— 10 vol
Vand	100,00		Vand		65 vol

Krom-myresyre (Rabl).

Kromsyre	0,33 %, 200	eller	Kromsyre	1 % — 75,00
Conc. myresyre	3—4 dr.		Conc. myresyre	5 dr.
			Vand	175,00

Maa altid frisk tilberedes. Fixering i 12—24 timer, udvaskning i vand; Hæmotoxylin, safranin. Udmærket fixering for kjærnedelingsfigurer. Præparaterne blir ikke eftersværtede.

3. Sublimat i 5 % eller mættet vandig (7 %) opløsning fixerer hurtigt og paalideligt.

I sublimatopløsning bør ikke bruges metalinstrumenter.

Smaa, ganske friske vævstykker fixeres i indtil 10 min. (blir graalige paa overfladen). Udvaskes i vand, bedre dog i alkohol, hvori sublimat er lettere opløseligt (33 %), helst tilsat med lidt iodtinctur. Ved utilstrækkelig udvaskning efterlades smaa krystaller af kviksølvforbindelser i vævet.

Efter udvaskningen efterhærdning i alkohol af stigende styrke til 90—94 %. Stykkerne blir haarde ved at ligge for længe i alkohol bagefter.

Sublimatfixerede præparater farves let med alle farver.

Ved tilsætning af klornatrium eller $\bar{A}$ trænger sublimatopløsningerne lettere gjennem vævet, fixerer hurtigere og frembringer mindre skrumpning.

Af de mange saadanne sublimatblandinger nævnes:

Langs vædske.

Sublimat	3—12	gr.
Klornatrium	6—10	»
Eddiksyre	5— 8	»
Vand	100,00	»

Fixerer i ½ time, efterhærdes i stigende alkoholer til 90 %, derpaa 2 dage abs. alkohol.

Heidenhains vædske.

Sublimat	7,5
Klornatrium	0,5
Vand	100,00

Til fixering af tarmepithelet.

Fixerer i 24 timer. Maa udvaskes nøiagtig i stigende alkoholer, 80—90—97 %, et døgn i hvert.

Pacinis vædske (III)
til fixering (og undersøgelse) af blod.

Sublimat	1
Klornatrium	4
Vand	200

Hayems vædske
til fixering og undersøgelse af blod (tælling).

Sublimat	0,5
Klornatrium	1,0
Sulph. natr.	5,0
Dest. vand	200,0

5. Pikrinsyre i mættet vandig opløsning. Trænger hurtigt gjennem objektet, fra etpar minuter til 24 timer. Brugelig til fixering af foetus.

Maa udvaskes meget nøie i alkohol, indtil al gulfarvning ophører i vædsken (aldrig med vand, der fremkalder opsvulming). Præparaterne farves meget godt med alle farvestoffe; der anvendes alkoholiske, ikke vandige opløsninger.

Pikrin-svovlsyre (Kleinenbergs vædske).

Svovlsyre 2 % —	100,00
Pikrinsyre saa meget, som vil opløses	
Vand	300,00

Anvendes til foetus. Fixerer hurtigt fra 3—4—24 timer. Grundig udvaskning. Vævet svulmer noget ved svovlsyren. Ved kalkholdige objekter kan Kleinenbergs vædske ikke bruges, da den med kalken danner uopløseligt kalksulfat, gips. Præparaterne farves senere let.

6. Alkohol er det i almindelig histologisk praksis mest anvendte fixeringsmiddel. Har som saadant mange fordele: tiltrænger ingen udvaskning, vævet er let at farve bagefter. Finere cellestrukturer, kjærnedelingsfigurer, kommer dog ikke godt frem ved alkoholfixering.

Anvendes til fixering i to styrkegrader: absolut alkohol og trediedelsalkohol. (Ranviers alkohol, alkohol 33 %).

Absolut alkohol (100—97 %) virker fixerende, idet æghviden hurtigt coagulerer, førend den vandextraherende evne kan faa gjøre sig gjældende.

Fixeringen ved passende store objekter udført paa 2—3 timer; cellekjærnerne fixeres her godt; efterhærdning i stigende

alkohol 70—80—90 %. Fixeringen kan ogsaa udføres med varm alkohol. Eller man skifter ny 94 % alkohol derpaa og hærder præparatet heri.

Trediedelsalkohol fixerer, idet den endnu er stærk nok til at koagulere albuminerne, medens der samtidig medføres saa meget vand, at nogen vandextraktion fra vævet ikke finder sted. Indvirkning ikke over 24 timer, da præparatet ellers macereres. Ingen videre god fixation af cellekjærner.

Efterhærdning i stærkere alkohol.

7. Formol eller formalin (formaldehyd, myresyrealdehyd) anbefalet af Blume og Hermann.

Det i handelen under navnet formol forekommende stof er en 40 % vandig opløsning af formaldehyd (CH_2O). I frisk tilstand klar blir vædsken ved henstand gjerne blakket ved hvide fnokker af paraformaldehyd og taber da i virkning.

Virker meget hurtigt, tillader næsten alle slags farvninger bagefter. Af præparater kan straks efter indvirkningen af vædsken gjøres frysesnit. (Side 96).

Fixerer i opløsning af 4—10—20 eller 40 % formol; meget godt epithelier, hvis detaljer kommer udmærket frem, desuden nerver, specielt centralnervesystemet, hvor det finder sin mest udbredte anvendelse, da det her tjener baade som fixerings- og hærdningsmiddel. Anvendes her ogsaa som fixationsmiddel i stedet for *Os* ved Golges farvning. Bindevæv paavirkes mindre heldigt, da det efter nogen tids indvirkning opløses, ligesom forslimes.

Ogsaa de lidt stikkende formoldampe virker fixerende, hærder gelatine.

Vævstykkerne lægges i 4—10 % formol ½—1 time op til 1 à 2 dage. Kan da skjæres med engang (frysesnit i formol se side 98) eller efterhærdes i alkohol med eller uden foregaaende udvaskning.

Formol er ogsaa et godt hærdningsmiddel specielt for centralnervesystemet.

Formol forbindes ogsaa fordelagtigt med andre fixations- og hærdningsvædsker eller kan benyttes sammen med frysning. (Se side 97).

Zenkers vædske, formolsublimat, til fin fixation af alle slags væv:

Sublimat	5,00	Altsaa en blanding af Müllers vædske og sublimat.
Bichrom. kali	2,50	
Sulph. natr.	1,00	
Iseddik	5,00	
Vand	100,00	

Iseddiken tilsættes først umiddelbart før brugen. Forøvrigt kan blandingen holdes færdig paa mørk flaske.

Smaa stykker er fortræffeligt fixerede i etpar timer, større bør ligge i 24—48 timer. De fleste farvninger, ogsaa fibrinfarvning og Weigerts nervefarvning, kan udføres bagefter. Til sidste farvning bør præparaterne dog have ligget i mindst 14 dage. Efter fixering vaskes stykkerne i rindende vand, behandles derpaa i jodalkohol for at fjerne de sidste rester af sublimat.

Orths Formol-Müllers vædske.

1) { Müllers vædske 100
Formol 10

Organdele indtil 5 mm. fixeres i 3 timer i 37° C., større i 10—12 timer og har da god snitkonsistens. Kan blive flere dage liggende i vædsken.

2) Udvaskes i rindende vand.

3) Efterhærdes i alkohol (90—94 %).

4) Farves paa alle vis.

---

8. Ophedning (kogning) er et fortræffeligt fixeringsmiddel. Ophedningen behøver theoretisk taget ikke at overskride æghvidens koagulationspunkt (62°). En temperatur af 80° er nok.

Ophedning er især nyttig, hvor de øvrige fixationsmidler kun langsomt vil kunne trænge ind (f. eks. insekter med skal), eller hvor man ønsker at faa koaguleret paa stedet æghvideholdige exsudater i vævene (lungeødem, nyreaffektioner osv.). Fixering ved kogning kan ske i vand, alkohol, sublimatopløsning osv.

Kogende vand. Vævstykket, kun faa mm. i tværsnit, lægges i et tyndt uhrglas, vandet koges i et reagensglas og hældes over stykket, efter etpar sekunder er fixeringen færdig; større stykker maa dog koges i flere minuter; efterhærdning i alkohol. Maa ikke komme i vand eller vandige farveopløsninger, i hvilke vævet blot svulmer op.

Hærdning.

De fleste fixeringsmidler bevirker ogsaa en mere eller mindre tydelig udtalt hærdning af vævet. Dog ikke alle. Endel er ogsaa macerationsmidler (se side 76) og kan derfor ikke anvendes i den nødvendige tid. Thi hærdningen udkræver forholdvis lang tid og større vædskemængde end fixeringen.

De vigtigste hærdningsmidler er kromsyre og alkohol.

Kromsyren anvendes ikke gjerne ublandet, da præparaterne blir skjøre deraf. Oftest som kromsure salte og i forbindelse med andre stoffe.

Müllers vædske.

Bikrom. kalici	2,00
Sulph. natr.	1,00
Vand	100,00

Bør opbevares paa mørk flaske 5—10 liter ad gangen, fordærves let af mugsop, hvorfor man paa overfladen lader flyde etpar stykker kamfer.

Erlickys vædske.

Bikrom. kal.	2,50
Sulph. cupr.	1,00
Vand	100,00

Begge har sin hovedanvendelse ved hærdning af centralnervesystemet, men egner sig ogsaa til kjertelorganer.

Orths Formol-Müllers vædske til fixering og hærdning (se side 88).

Zenkers vædske ɔ: Sublimat-Müllers vædske til fixering og hærdning (se side 88).

Müllers vædske fremkalder opsvulmen af mucinholdige vævsdele (bægerceller, slimdegeneration), som derved lettere paavises (ved alkohol koagulerer mucinet og trækker sig haardt sammen). Overfladeepithel macereres og løsner ved længere tids ophold i Müllers vædske. Bindevæv forbliver blødt. Ben, særlig foetale, dekalcineres.

Hærdningen i de kromsure salte foregaar langsomt.

En hel hjerne (menneske-) behøver 6—8—10 uger. Den maa lægges paa blødt underlag (vat, filtrerpapir i flere lag) i rigelig vædske og forsynes med flere dybe indsnit, at vædsken kan trænge i dybden, da ellers kun de ydre partier hærdes, medens de centrale dekomponeres. Vædsken skiftes den første uge hver dag, senere saa ofte vædsken er uklar.

Hel rygmarv ophænges helst i et høit glas. Vædsken skiftes som ovenfor nævnt. Hærdningstid 4—5 uger. Mindre stykker hærdes hurtigere.

Ved anvendelse af forhøiet temperatur i varmeskab 35—38° C., kan hærdningstiden betydelig forkortes, indtil for en hel hjerne 8—14 dage, en rygmarv 6—8 dage.

For langt ophold i Müllers vædske gjør gjenstandene haarde og sprøde.

I regelen maa præparater, hærdede i Müllers vædske, udvaskes meget godt enten i flere dage i rindende vand, eller i alkohol, ligesom man gjerne efterhærder i alkohol. Efterhærdningen maa foregaa i mørke for at undgaa udfældning.

Hvorvidt og hvorledes udvaskning og efterhærdning skal foretages, er dog afhængigt af præparatets senere behandling, idet de i vævet tilstedeværende kromsalte eller alkohol snart kan være hindrende, snart nødvendige for den paafølgende farvning, f. eks. Weigerts nervefarvning (se nedenfor under de specielle farvninger).

Alkohol er ogsaa til hærdning det mest anvendte stof.

Benyttes, hvor de bedste resultater skal opnaaes, i stigende styrke 70—80—90 %, et døgn i hver. De fleste præparater har da faaet en passelig fasthed, let at skjære. Dog er dette hensyn nu for tiden af mindre vigtighed, idet man ved indleiringer (se herunder) kan komme til at skjære præparater af enhver konsistens. Til god hærdning udkræves rigelig vædskemængde.

Brugt og forurenset alkohol kan ved omdestillation atter gjøres brugbar, undtagen naar den indeholder mineralsyrer, der under destillationen spalter alkohol til æther.

I den almindelige histologiske praksis — normal som pathologisk — kommer hærdning med stigende alkoholer sjeldnere til anvendelse, naar det ikke gjælder finere kjærne- og protoplasmastrukturer. Man vil i regelen opnaa tilfredsstillende resultater, om de friske præparater med en gang lægges i stærk alkohol 90—96 % i 24—48 timer, hvor fixering og hærdning samtidig udføres.

Formol anvendes som hærdningsmateriale mest til centralnervesystemet baade til makro- og mikroskopiske formaal.

En hel hjerne lægges i 2 liter, en hel rygmarv i 7—800 cc. af ½—1 % formolopløsning. Allerede efter 2 dage vil rygmarven, efter 4—5 hjernen have antaget en fast elastisk konsistens (Rèné Marie) uden forandring i form eller farve, meget hensigtsmæssig for demonstrationsbrug. Mindre stykker kan derefter udtages til videre mikroskopisk undersøgelse.

Om formolens kombination med sublimat og Müllers vædske er ovenfor talt.

Saaledes fixerede og hærdede præparater opbevares hensigtsmæssigst i alkohol fra 80—98 %. De i metalsyrer og salte fixerede præparater blir temmelig haarde i de stærkere alkoholer.

Dekalcinering.

I ben og andre kalkholdige præparater maa kalken først fjernes, før der kan gjøres snit af dem.

Denne dekalcinering udføres især ved forskjellige organiske og uorganiske syrer. Svovlsyre er dog naturligvis ubrugelig, da denne med kalk danner uopløselige gipskrystaller i vævet.

Det bør iagttages, at den anvendte syre ikke angriber de morfologiske bestanddele. Derfor har f. eks. salpetersyre, der fixerer vævene, visse fordele for den ublandede saltsyre, der bringer bindevæv til at svulme op.

Før dekalcineringen bør vævet hærdes i alkohol eller helst i Müllers vædske.

Til de fleste dekalcineringsvædsker kan ogsaa tilsættes substanser, der fixerer og hærder vævet forøvrigt, f. eks. alkohol, sublimat, for saa vidt dekalcineringsmidlet ikke selv virker fixerende og hærdende som ved kromsyre eller pikrinsyre.

Saa godt som alle dekalcineringsprocesser udkræver lang tid, uger og maaneder. Under processen maa der stadig tilsættes ny vædske for at erstatte den syre, der er neutraliseret af den opløste kalk.

Naar dekalcineringen er færdig, lader benet sig bøie og skjære som brusk, ligesom en naal let trænger igjennem samme. Instrumenterne maa øieblikkelig renses nøiagtigt efter prøven.

Benet sages først i stykker, helst ikke over 3—4 mm. i tykkelse.

Saltsyre.

Dekalcinerer hurtigt og godt, præparaterne farves ogsaa godt efter, men saltsyren fremkalder en betydelig opsvulmen af osseinet, omtrent som eddiksyre, saa mange strukturforholde i benet (benlegemernes form, primitivkanaler osv.) svinder.

Ren konc. saltsyre isolerer tandrør.

Saltsyre 0,5—10 % vandig opløsning dekalcinerer smaa ben i løbet af faa dage. Vædsken omrystes.

Saltsyrens skadelige indvirkning paa osseinet hindres i nogen grad ved tilsætning af klornatrium eller alkohol til vædsken.

von Ebners vandige dekalcinationsvædske.

Klornatrium	12
Vand	100
Saltsyre	4

Under dekalcineringen maa daglig paany tilsættes 1—2 % saltsyre for at erstatte det brugte, indtil benet er blødt.

Udvaskes i saltholdigt vand, til al sur reaktion er svunden.

von Ebners alkoholiske dekalcinationsvædske.

Saltsyre	2,5
Klornatrium	2,5
Vand	100,00
Alkohol 70 %	500,00

Haugs alkoholiske saltsyreblanding.

Saltsyre	1—5
Klornatrium	0,5
Alkohol 70 %	100,00

Virkningen noget langsom, men kan paaskyndes ved at øge saltsyremængden til 10 %, saltmængden maa følge med det halve beløb.

Salpetersyre (et af de bedste dekalcineringsmidler).

Dekalcinerer hurtigt og godt, præparaterne farves meget godt senere, ingen opsvulmning af vævet. Forbindes gjerne med alkohol eller kromsyre.

Ren (ikke rygende) salpetersyre bruges kun til at isolere tandfibriller (som saltsyre).

I fortynding til dekalcinering, 3—9 %, virker hurtigt.

Haugs salpetersyre-alkohol.

Sublimatfixerede præparater dekalcineres i:

Ren salpetersyre sp. v. 1,5—1,2	30—90
Alkohol 70 %	1000,00
(Klornatrium	2,5)

Virker hurtigt, skaansomt, anvendeligt til alle slags ben (ungt, gammelt, pathologisk og normalt brusk og ben). Udvaskes i alkohol.

Alle farvninger lykkes godt her.

Thomas' salpetersyremethode med kalknøjtralisation.

Benstykker hærdes i 95—96 % alkohol.

Dekalcineres saa i:

Konc. tysk offic. ren salpetersyre	1 del
Alkohol 95 %	5 dele.

Vædsken rystes ofte, skiftes hver 3die dag, dekalcinering færdig efter 2—3 uger for store stykker.

Stykkerne afspyles i alkohol, nøitraliseres i alkohol 95°, hvori overskud af præcipiteret kulsur kalk, i 8—14 dage, hvorpaa kalken afskylles med spiritus.

Haugs phloroglucin-salpetersyre angives at skulle dekalcinere hurtigt og skaansomt. Blandingen anvendes i to forskjellige koncentrationer.

Stærk phloroglucin-salpetersyre.

Phloroglucin 1,00 gr. opvarmes langsomt og forsigtigt med 10 cc. ren, ikke rygende, salpetersyre (sp. v. 1,4) under let omrysten, ved hvilken der foregaar en stærk opbrusen (forsigtig, stor kolbe!), medens vædsken antager en mørk rød farve. Dernæst fortyndes med 100 cc. vand og tilsættes yderligere 10 cc. salpetersyre. Ønskes større vædskemængde, kan yderligere tilsættes 200 cc. vand og 40 cc. salpetersyre, for at holde syregehalten paa 20 %. Stærkere fortynding af phloroglucin er ikke heldig.

Det valgte benstykke, f. eks. pars petrosa o. l., der paa forhaand maa være godt fixeret i sublimat eller i Orths Formol-Müllers vædske (se side 88) og derefter udvasket, bliver i denne vædske dekalcineret i løbet af faa timer; foetale eller unge ben behøver endog blot ½—1 time.

Udvaskningen maa foretages meget grundigt i rindende vand i mindst 2 døgn (!). Præparaterne lader sig da farve meget godt.

Svag phloroglucin-salpetersyre.

Phloroglucin	1,00
Ren salpetersyre	5,00
Alkohol 70 %	100,00

Dekalcination i løbet af 6—8 dage.

Phloroglucinen synes at beskytte vævet mod en altfor voldsom indvirkning af den — indtil 20 % — stærke salpetersyre.

Waldeyers krom-salpetersyreopløsning for pars petrosa.

Friske præparater fixeres i en kromsyreopløsning 1 : 600, hvis styrke gradvis gjøres jevnt stigende til 1 : 400 og 1 : 200. I denne sidste blanding foregaar dekalcineringen, idet vædsken skiftes hver 6te dag, samtidig med at der tilsættes 2 % salpetersyre.

Processen er, som alle kromsyremethoder, langvarig, tager ca. 3 maaneder. Præparaterne farves vanskeligt under den senere behandling. Omhyggelig udvaskning, alkoholhærdning.

Pikrinsyre i mættet vandig opløsning dekalcinerer, om end langsomt (maanedsvis) under samtidig fixering; syren udvaskes bagefter grundigt i alkohol. Processen kan paaskyndes ved tilsætning af 3—5 % salpetersyre. Er en skaansom methode, der godt egner sig for foetale og bløde ben. Præparaterne farves godt bagefter.

Melkesyre 10—20 %, skaansom og taalelig hurtig, god til foetale ben.

Endelig kan dekalcinering ske ved hjælp af glycerin, Müllers vædske, Flemmings- eller Fols krom-blanding. Processen gaar dog her meget langsomt. For særdeles fine embryonale ben (begyndende forbening) er Müllers vædske anvendelig.

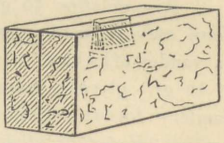
Fastklæbning. Frysning. Indklemning og indstøbning.

Kun meget store og grove præparater kan holdes direkte i fingrene, medens de skjæres. Smaa, fine, bøielige præparater maa paa forhaand indklemmes, indstøbes eller anderledes behandles.

Til indklemning anvendes bedst hærdet svinelever, amyloid lever, hyldemarv eller alkoholhærdet gulrod. Den sidste skaffer man sig ved at skjære en stor gulrod op i stykker paa 5 × 3 ctm.s flade, 1 ctm. tykkelse og opbevare disse i rigelig 70 % alkohol. Efter etpar uger har de opnaaet en passelig seig konsistens og staar da altid færdig til brug.

I et stykke af den hærdede lever eller gulrod udskjæres med en liden kniv en fordybning saa vidt stor, at præparatet passer deri. Et andet stykke lægges over og man begynder at skjære fra kanten, saa at man selvfølgelig ogsaa faar snit af indleiringsmaterialet med.

Fig. 57.



Hyldemarv kan kun bruges, naar den er vel 1 ctm. tyk. Et omtrent 3—4 ctm. langt stykke kløves forsigtig efter længden med en skarp kniv. I den bløde, tørre marv trykkes med en pincet eller lignende en hulning, svarende til præparatet. Dette lægges ind, den anden halvdel af marvstykket lægges over og holdes fast med fingeren eller bindes med en traad. Idet stykket nu fugtes med alkohol eller vand, sveller den sammentrykkede marv ud og fastholder præparatet med et jevnt elastisk tryk, der er mere skaansomt end det ved lever- og gulrodindklemningen udøvede fingertryk.

Ved al indklemning maa det paasees, at præparatet paa alle sider er fuldkomment omgivet af indklemningsmidlet, ellers faar snittene let forrevne rande.

Fastklæbning.

Stundom kan præparatets form eller den forønskede snitretning, f. eks. fladesnit gjennem en tarmvæg eller andre membranagtige vævsdele, gjøre indklemningen uanvendelig.

I mange tilfælde kan man da komme til maalet ved at fæste gjenstanden til et stykke kork, hyldemarv eller lignende ved gummi, glycerin, gelatin o. l.

For tiden vil man vistnok i saadanne tilfælde heller anvende indstøbning af præparatet, men leilighedsvis kan dog ogsaa fastklæbning komme til anvendelse.

Gummi arabicum.

En almindelig gummiopløsning stryges passelig tykt over den glatte tværende af en vinkork. Præparatet trykkes ned i gummien, hvorpaa man lader det tørre en stund, og lægger saa korken og stykket i 90—96 % alkohol, hvori gummien størkner til hvide faste masser. Da disse let kan skade en fin knivseg, maa gummien ikke gaa høit op over præparatets sider, og methoden egner sig ikke for fladesnit, kun for større stykker. Ved anvendelse af noget tynd gummiopløsning blir den hærdede gummi mindre farlig for kniven.

Farrants gummiopløsning:

Gummi arabicum	4 dele
Vand	4 dele
Glycerin	2 dele,

blandes sammen, indtil gummien er opløst. Tilsættes lidt kamfer for holdbarhedens skyld.

Benyttes som ren gummiopløsning, i England ogsaa meget til indstøbning og til indleiring af snit under dækglasset.

Glyceringelatin (glycerinlim).

Ren gelatine 50 gr. opklippes i smaastykker, tilsættes saa meget vand, at dette saavidt dækker, staar saaledes i 2 timer, eller til gelatinen er opblødt, da vandet afhældes. Gelatinen smeltes forsigtig paa vandbad under tilsætning af 50 gr. glycerin, samt 1—2 gr. ren karbolsyre (eller efter afkjølingen lidt kamfer) for at forhindre mugning. Blir halvfast, elastisk ved afkjøling. Opbevares ganske praktisk i en aaben skaal, der sættes med bunden i veiret, saa støv ikke kommer til. Skal massen bruges, opvarmes den direkte over flammen, dryppes paa korken og afkjøles, hvorpaa fuld fixation opnaaes i 96 % alkohol. Blir da bruskagtig fast, generer ikke kniven, men bør fjernes af snittene ved at disse et øieblik lægges i varmt vand, da de ellers bugter og krøller sig under de senere processer.

Frysning.

Frysesnit kan kun gjøres ved hjælp af dertil indrettede frysemikrotomer (se nedenfor) og kun paa præparater, som enten er friske eller hærdede i vandige opløsninger, som Müllers vædske, formol o. l. Vil man gjøre frysesnit af alkoholpræpa-

rater, maa disse først lægges i vand 8—10 timer, saa al alkohol er udtrukket.

Til frysning bør ikke anvendes stykker af mere end 1—2, høist 3—4 mm.s tykkelse. Stykket anbringes paa mikrotomens frysebord, mod hvis underflade der ved hjælp af en koutschoukballon sendes en fin ætherdusch. Ved ætherens fordampning bindes saa megen varme, at stykket fryser til en fast masse, der dog ikke bør blive for haard. Konsistens som lidt fast frugtis er bedst. Frysesnit af friske præparater er gjerne lidt tykke, neppe under 30 μ., efter foregaaende hærdning kan de faaes tyndere. Det bør og erindres, at dannelsen af iskrystaller i vævet kan fremkalde forrykkelser i de normale forhold.

Frysemethoden har sine fordele, hvor det gjælder hurtigt at faa et oversigtssnit af friske vævsdele, f. eks. under en sektion, medens denne endnu varer. Saadanne friske (ikke hærdede) snit egner sig dog ikke til farvning.

Man kan derfor med fordel hærde stykkerne før frysningen, man faar da bedre farvning og tyndere snit.

Plenge angiver følgende (allerede af Cullen antydede) hensigtsmæssige frysemethode:

1) Tynde stykker — ikke over 1 mm. tyk — hærdes ½—1 time i 4 % formol.

2) Fryses og skjæres.

3) Snittene lægges i 50 % alkohol for at fjerne luftblærerne.

Disse snit kan behandles med alle slags farvninger (ogsaa Weigerts og Golgis nervefarvninger) og kan indleires i glycerin eller kanadabalsam.

Indstøbning.

Celloidin og paraffin.

Indstøbningen er den fuldkomneste maade at forberede objektet til skjæring. Den bestaar deri, at det hele objekt gjennemtrænges af en opløst eller smeltet substans, som senere stivner enten ved fordampning eller ved afkjøling og meddeler objektet i dets hele masse en jevn fasthed.

Indstøbning bruges derfor især, hvor man vil have meget tynde, meget store eller jevne snit; desuden hvor objektet trods hærdning er af en meget blød eller ujevn konsistens, let sønderrives, er opfyldt af hulrum eller paa yderfladerne bedækket med delikate vævselementer, f. eks. epithelier, som vilde skades ved klemningen i lever o. l. De stigende fordringer til snittenes egenskaber vil uden tvivl bevirke, at man efterhaanden indstøber alle præparater. For de finere snit er denne forberedelse en uafviselig nødvendighed.

Til indstøbning har været anvendt et stort antal stoffe bl. a. gummiopløsning, Farrants vædske, glyceringelatine, æghvide, sæbe osv. For tiden er der i mikroskopisk praksis kun tale om to stoffe celloidin og paraffin.

Celloidinindleiring er anbefalet og methodisk udarbeidet af Schiefferdecker. Celloidin er en i æther og absolut alkohol opløst nitreret cellulose (skydebomuld), altsaa en slags collodium, hvilket stof allerede før har været anvendt af Duval til indstøbning.

Celloidin forekommer i handelen i plader (Scherings celloidin) af opak, hvidgul farve og brusklignende konsistens. Disse plader indeholder endel alkohol, æther og vand. Ved indtørkning blir de haarde som horn og ubrugelige, maa derfor opbevares paa vel lukket glas, helst opskaaret i smaa spaan eller levninger eller raspet til fint pulver (Apathy). Disse smaa stykker kan gjerne tørke ind, de giver da ved den senere opløsning i ætheralkohol endog en klarere vædske.

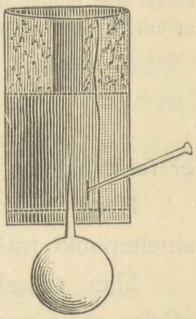
Ved tilsætning af æther og absolut alkohol (betegnes ved A + A) opløses og sveller den faste celloidin. Der anvendes gjerne to saadanne opløsninger, en tyndere, der flyder omtrent som ol. ricini, en tykkere af sirupskonsistens. Den sidste faaes ved at blande lige vægtsdele celloidin, æther og alkohol sammen og lade dette henstaa til fuldstændig opløsning.

Indstøbning i celloidin.

1. Præparatet, der ikke bør være mere end 1 ctm. i tværmaal, lægges i frisk 96 % alkohol i 24 timer.
2. Overflyttes i rigelig A + A i 24 timer, større objekter maa ligge henholdsvis 2 og flere dage heri for at fjerne ethvert spor af vand, der vil hindre celloidinopløsningens indtrængen. Vædsken bør da byttes daglig. Mange objekter, f. eks. hele øine, bør forsynes med indsnit, forat vædsken kan trænge ind.
3. Tynd celloidin fra 24 timer til flere uger, efter objektets størrelse og beskaffenhed. I almindelighed er ved smaa præparater 1 døgn fuldt tilstrækkelig, men det maa erindres, at trænger ikke celloidinen gjennem hele objektet, vil snittene blive ujevne og tildels ubrugelige.
4. Sættes paa kork, (træ eller metal). Smaa objekter fæstes uden videre paa den glatte ende af et stykke kork ved hjælp af lidt tyk celloidin, som ogsaa hældes over præparatet. Stykket maa sættes i den for skjæringen heldigste stilling, maa ofte foreløbig støttes med knappenaale o. l. før celloidinen er størknet. Istedetfor kork kan fordelagtigt ogsaa firkantede træstykker med nogle faa kvadratcentimeters overflade anvendes.

   Det er ofte hensigtsmæssigt at omgive særlig lange, tynde gjenstande, f. eks. nerver, med en større celloidinmasse. Korken omvikles da med en kant af papir, og den derved fremkomne fordybning fyldes med celloidinopløsning.

   Fig. 58.



   Baade lufttørring og hærdning i alkohol (punkt 5) tager da længere tid. Papiret maa fjernes før skjæringen. Hensættes nogle minuter i luften, til celloidinen er saavidt størknet, at korken kan vendes, uden at det falder af.

   Større objekter, f. eks. et helt øie, kræver en langsommere og mere omhyggelig fordampning af A + A, dersom snitkonsistensen skal blive jevn. Det er da hensigtsmæssigt at hælde celloidinen med præparatet ned i en vidhalset aaben glasskaal, en «afskjæring», som dækkes med etpar objektglas, saaledes, at der mellem dem blir en aabning, igjennem hvilken ætheralkoholen langsomt kan fordampe. Naar celloidinen er bleven omtrent geléhaard, efter 1 eller flere dage, løsnes den forsigtig fra glassets rande med en kniv eller der skjæres ud stykker, forat fordampningen skal kunne gaa lettere for sig i dybden. Naar fingeren ikke længere sætter mærker i celloidinen, er den rette konsistens naaet.
5. Hærdes i alkohol 80 %. De paa kork satte mindre stykker lægges straks i 80 % alkohol i lukket glas, hvor de efter 4—6 timer antager en for skjæringen passende brusklignende konsistens. I varmeskab 30—37° C. er ca. 1 times henstand nok.

   De større stykker overhældes i sin skaal med 80 % alkohol, hærdes i løbet af et par dage til snitkonsistens.

Saaledes indstøbte præparater kan opbevares i lange tider i 80 % alkohol færdige til skjæring. Præparater paa kork bør dog ikke ligge for længe, da den ved alkoholen af korken udtrukne garversyre er skadelig for den senere farvning af præparatet. Er præparaterne fæstet paa træstykker, kan disse signeres med blyant paa undersiden.

Ganske som celloidin kan ogsaa anvendes photoxylin, ligeledes nitrocellulose, nitreret bomuld. Det ser ud som almindeligt bomuld, er temmelig explosibelt, hvorfor det bør opbevares beskyttet mod varme, slag og stød, helst i fugtig tilstand (tilsat lidt vand paa krukken), da det i saa fald er mindre farligt.

Opløses i A + A til en sirupstyk masse, anvendes ganske som celloidin.

Celloidinindleiring gjør udmærket tjeneste overalt, hvor ikke de fineste snit udkræves, dog kan der opnaaes celloidinsnit ned til 5 μ.

Celloidinen er særlig egnet for store snit, ligesom de fleste histologiske farveprocesser lader sig udføre, uden at celloidinen behøver at fjernes af snittene (carmin, hæmotoxylin, fibrinfarvning, tuberkelfarvning).

Celloidinen antager ved hærdning i kloroform et melket udseende og blir ugjennemsigtig, saa man ikke let kan orientere sig angaaende præparatets stilling; ved thymianolje, karbolsyre, bergamotolje opklares den.

Skjæring af celloidinsnit udføres ved mikrotom. Kniven stilles da saa skraat som muligt, holdes godt vædet med 70—80 % alkohol, og snittene tages af kniven med en blød alkoholfugtet pensel: kan opbevares paa 80 % alkohol.

Paraffinindleiring

er først angivet af Klebs.

Hertil benyttes de i handelen forekommende paraffiner med smeltepunkt fra 35—58° C.

Man udvælger eller laver sig ved blanding en paraffin af den mest passende haardhed.

Lee anbefaler ikke at bruge paraffiner med høiere smeltepunkt end 48° C., naar værelsets temperatur er 22° C. Hvis værelsetemperaturen er saa høi, at haardere paraffin fornødiges, bør man heller udsætte arbeidet.

Stöhr foretrækker til de fleste formaal en paraffin, der smelter ved ca. 50° C. og som tilberedes ved under opvarmning at blande 30 gr. paraffin smp. 45° C. med 25 gr. paraffin smp. 52° C. — Denne passer til en stuetemperatur af 20° C.

Til mange formaal er ogsaa en haardere paraffin, smp. 52° C., hensigtsmæssig.

Forøvrigt maa paraffinens haardhed (smeltepunkt) varieres efter objektets haardhed, snittenes forønskede finhed og den omgivende lufts temperatur (jo haardere objekt, finere snit og større varme, desto haardere paraffin). Den rigtige hensyntagen til alle disse momenter læres kun ved øvelse.

Den frisk fabrikerede, let blaalige paraffin har tilbøielighed til at krystallisere og er derfor mindre hensigtsmæssig til indstøbning. Ældre, aflagret paraffin, der antager let rosafarve, er mere homogen og bør foretrækkes. (Lee).

Tilbøieligheden til krystallisation svinder, naar paraffinen opvarmes og holdes flydende i flere timer. Dens smeltepunkt stiger imidlertid da gjerne et par grader.

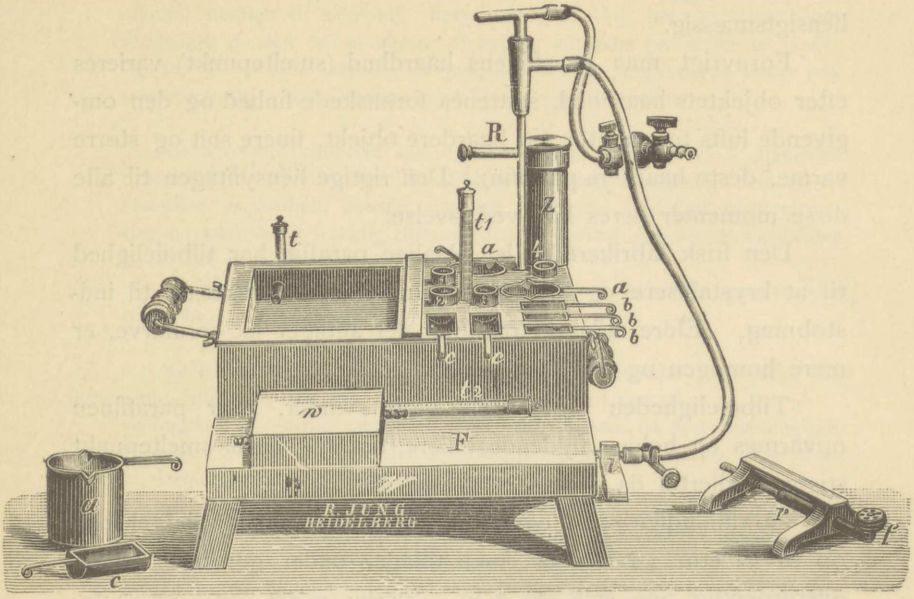
Paraffinindleiringen egner sig bedst for smaa objekter paa op til $^3/_4$ ctm. i tværmaal, men tillader under gunstige forhold overordentlig fine snit (5—2 μ). Særlig egnet for «seriesnit». Større snit skjæres ikke saa godt som i celloidin, der er seigere. Farvningen maa enten være udført paa forhaand gjennem hele præparatet (farvning «en bloc»), eller den kan foretages paa objektglasset, efterat paraffinen er fjernet.

Indstøbning i paraffin.

Præparatet deshydreres nøiagtigt i absolut alkohol, efter størrelsen paa 3—4 timer til flere dage; ombytte af alkohol.

Lægges i et paraffin opløsende stof, f. eks. kloroform, xylol, cederolje i 24 timer. Lægges i smeltet paraffin ca. 50° C. i 1—12 timer. Ved for høie temperaturer skrumper præparatet. Paraffinen kan ophedes paa vandbad, men bør ikke udsættes for indvirkning af vanddamp. Bedst foregaar indsmeltningen ved hjælp af den af Mayer konstruerede «Neapelerovn» med automatisk temperaturregulering, men i nødsfald kan man ogsaa bruge en almindelig natlampe med fedolje, hvor varmen reguleres ved at variere karrets høide over flammen. Naar paraffinen er trængt grundigt gjennem præparatet, hældes dette og en del af den flydende paraffin i en liden støbeform, der enten kan laves af sammenfoldet, lidt tykt papir eller af to vinkelbøiede metalstykker, der sættes paa høikant paa en lidt opvarmet glasplade (se fig. 60). Præparatet orienteres hurtigt, medens paraffinen endnu er flydende og gjennemsigtig, ved hjælp af opvarmede

Fig. 59.

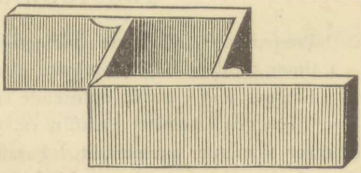


Paraffinovn, «Neapelerovn».

naale, hvorpaa en hurtig størknen af paraffinen bevirkes enten ved at lægge blokken i koldt vand eller paa is (sne). Ved hurtig afkjøling blir massen mer homogen, medens langsom afkjøling begunstiger en krystallinsk beskaffenhed a massen, der er uheldig for skjæringen.

Efter de forskjellige stoffe, som bruges, kan man gaa frem paa forskjellige maader.

Fig. 60.



a. 1. Deshydrering i absolut alkohol 12—48 timer.
   2. Overføres i kloroform, indtil stykket heri synker tilbunds, eller xylol 24 timer.
   3. Kloroform-paraffin lige dele, indtil det heri synker tilbunds, eller i xylol-paraffin.
   4. Smeltet ren paraffin, 50—56° C., 1—12 timer, efter præparatets beskaffenhed.
   5. Indstøbning.

eller

b. 1. Deshydrering i alkohol.
   2. Overføres i cederolje f. eks. i et reagensglas, indtil det heri synker tilbunds.
   3. Smeltet ren paraffin, som ovenfor.
   4. Indstøbning.

For at forene baade celloidin- og paraffinindleiringens fordele, paa den ene side store, elastiske og let tingerbare, paa den anden side ogsaa tynde snit, har man kombineret begge indstøbningsmethoder.

En saadan kombination er

Kultschizskys celloidin-paraffinindleiring.

1. Stykkerne deshydreres i A + A.
2. Celloidin 24 timer.
3. Gjennemtrækkes med ol. origani (Ryder anbefaler kloroform).
4. Ol. origani + paraffin (40° C. smp.).
5. Paraffin, — støbes.

Saaledes indstøbte stykker holder sig godt i tør tilstand, giver fine tynde snit uden udfaldende smaapartier.

Kultschizskys methode er noget omstændelig, og paraffinen har vanskeligt for at trænge jevnt gjennem hele blokken.

Som en forbedring i begge henseender angives

Field og Martins paraffin-celloidin-indleiring.

1. Stykket deshydreres i absolut alkohol,
2. lægges 4—5 timer i toluol. + abs. alk., lige dele,
3. lægges 24 timer* i en paraffin-celloidinblanding tilberedt paa følgende maade:

   Stærkt tørret celloidin gjennemfugtes med toluol., overhældes derpaa langsomt med en blanding toluol. + abs. alk. lige dele. Celloidinen opløses heri til syrupskonsistens. I denne celloidinsyrup opløses igjen smaa stykker paraffin ad gangen til koncentration, vædsken bør tilslut opvarmes forsigtigt (!) for at paaskynde opløsningen.
4. Fra paraffin-celloidinopløsningen bringes stykket

   enten

   i en mættet kloroform-paraffinopløsning, hvorefter der fortsættes som vanlig ved paraffinindleiring,

---

* Field og Martins originalmeddelelser indeholder her ingen tidsangivelse.

eller

det lægges i en liden krukke, saavidt dækket af paraffin-celloidinopløsningen, hvortil der nu under opvarmning (forsigtig!) tilsættes gradvis smaa stykker paraffin, til vædsken næsten ganske bestaar heraf.

5. Behandles som paraffinsnit, dog maa nellikolje og andre stoffe, der indvirker paa celloidin, undgaaes.

Methoden er opfundet for undersøgelse af tykskallede insekter. Turde egne sig specielt for neglesnit.

Skjæring.

De mikroskopiske snit udføres enten paa frihaand eller med mikrotom.

Den første betingelse for gode tynde snit er en god skarp kniv. Kniven maa derfor behandles omhyggeligt, aldrig bruges til andet end de fine mikroskopiske snit, specielt ikke til haarde bruskede eller benede ting, og naturligvis ikke udsættes for indvirkning af syrer eller kemikalier eller voldelig overlast. Den afstryges før og efter hver gangs brug paa en god strygerem (Zimmer's) med haardt underlag. Det er en nydelse at skjære med en god kniv, en lidelse med en slet.

Til frihaandsskjæring benyttes helst en bredbladet kniv af form omtrent som en barberkniv men med plan underflade.

En almindelig barberkniv kan dog ogsaa bruges.

Kniven maa under skjæringen stadig holdes fugtet med alkohol (eller vand), saa snittene flyder op heri.

Præparatet holdes mellem venstre haands tommel- og pegefinger, mod hvilken sidste knivens underflade finder støtte. Snittene udføres ved en jevn, dragende bevægelse af kniven, saa at saa lang en strækning som muligt af eggen kommer til anvendelse. Kniven maa trækkes, ikke trykkes eller sages gjennem præparatet.

Der skal en del øvelse til at gjøre gode, jevne, tynde snit paa fri haand. Man maa øve sig op paa ganske smaa, velhærdede objekter og først, naar dette lykkes godt, da gaa over til større. Men enhver mikroskopiker bør være istand til at levere brugbare snit med barberkniven baade for i en fart at kunne skaffe sig oversigtssnit og for ikke at være afhængig af mikrotomer i alle tilfælde. Med nogen ihærdighed kommer man snart saa vidt, ingen maa tabe modet paa grund af læretidens skuffelser.

Er præparatets forskjellige dele af ulig haardhed, f. eks. corion og epidermis i huden, bør det holdes saaledes, at kniven først gaar gjennem det blødere parti (corion) og tager det haardeste til slut.

Snittene maa som regel være temmelig tynde, dog vil naturligvis snittykkelsen altid maatte variere efter objektets natur og undersøgelsens formaal. At undersøge nerveforgreningernes forløb i tynde snit vil lige saa lidt føre til noget resultat som at søge efter celleformer i tykke snit.

For begynderen vil dog snittene fra først af gjerne blive for tykke og ujevne. Man skjære kun videre med taalmodighed, indtil man med en gang faar det fornødne lag i haanden, og de første præsentable snit overrasker en. Hold da ikke op, men benyt øieblikket og skjær videre — man kan da faa en liden serie gode snit med en gang. Det er for den senere behandlings skyld især for begynderen godt at have en del snit i reserve.

Snittene tages forsigtig af kniven med en pensel eller en naal (skaan knivseggen!) og lægges straks i en liden skaal med vand eller i regelen alkohol (70—80 %).

Mikrotomer.

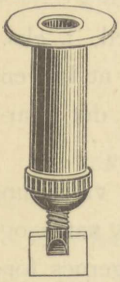
De fordringer, som nutidens undersøgelser stiller til de mikroskopiske snits tyndhed, udstrækning, regelmæssighed og

ubrudte rækkefølge, kan dog selv ikke den betydeligste øvelse og færdighed i frihaandsskjæring fuldt ud tilfredsstille.

Man anvender i saa fald særegne instrumenter, mikrotomer, af noget forskjellig konstruktion (cylindermikrotomer, slædemikrotomer, supportmikrotomer, rockingmikrotom osv.).

1. Cylindermikrotomen (Oschatz, Ranvier), er den ældste konstruktion. Bestaar i en cylinder nedad lukket med en bevægelig bund, opad forsynet med en bred, plan krave.

Fig. 61.



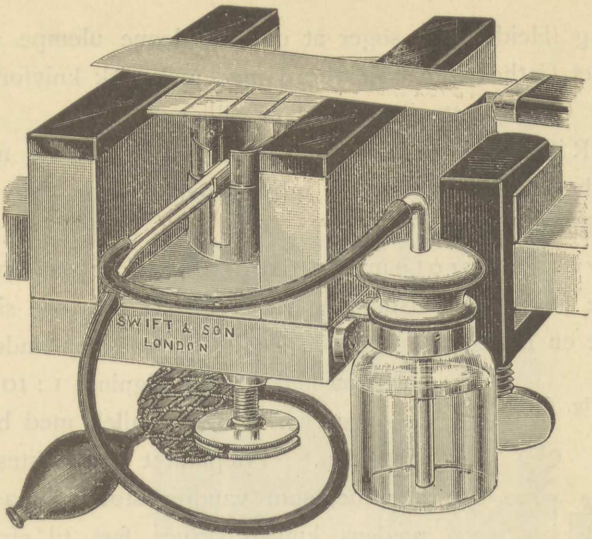
Ranviers Mikrotom.

I dette rør fæstes præparatet ved indklemning eller støbning; ved hjælp af en skrue føres den bevægelige bund og dermed præparatet op over rørets munding, hvor det skjæres paa fri haand, idet kniven glider paa den plane krave. Skruen gives ofte en inddelt rand, hvorpaa snittykkelsen kan aflæses. Disse mikrotomer, der i de senere aar er bleven adskillig forbedrede, er ganske hændige som støtte for haanden ved pathol. kliniske undersøgelser af ikke altfor store objekter, men kan ikke gjøre fyldest ved finere undersøgelser. Gottscham mener, at $^1/_{50}$ mm. er de tyndeste seriesnit. Pris 20, 60 og 80 kroner.

Efter samme princip, men noget modificeret er Cathcarts frysemikrotom konstrueret. Præparatet er her placeret enten paa en liden metalplade, hvor det fryses ved hjælp af æthersprit (alkoholpræparater maa da paa forhaand være udvaskede 1 times tid i vand), eller i en cylindrisk klemme, som hæves af mikrometerskruen. Kniven er ganske flad, har haandtag i begge ender og føres som en høvl støttet mod 2 glaslister, der løber en paa hver side af præparatet. Det er et billigt instrument, koster ca. 24 kroner.

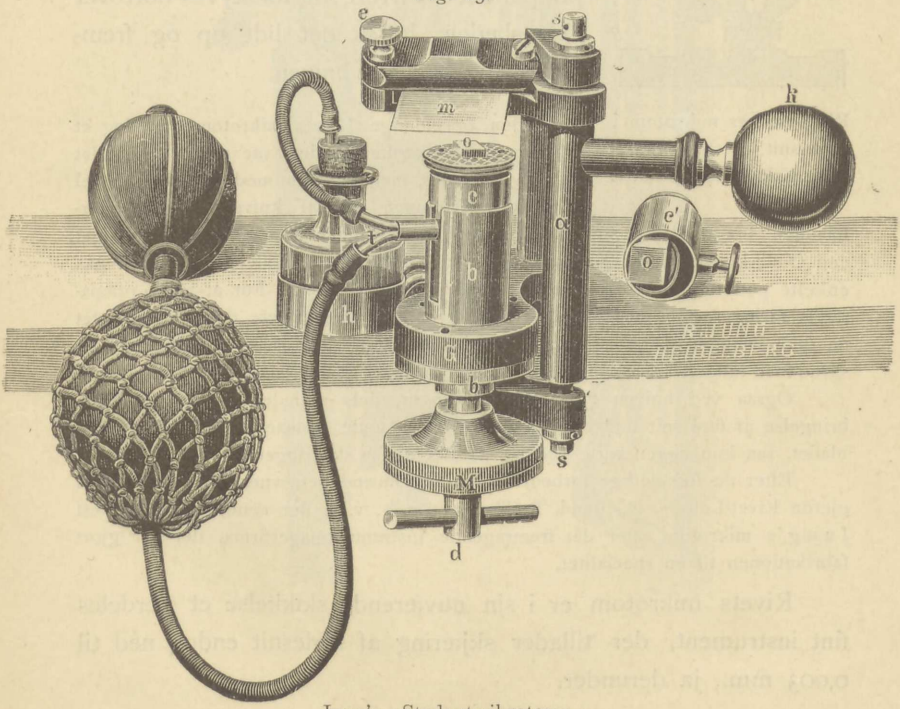
Ved disse Oschatz-Ranviers og Cathcarts mikrotomer hefter dog den svaghed, at kniven føres med fri haand — og selvfølgelig noget ujevnt — samt at knivens underflade under føringen tildels slæber hen over præparatet, hvorved dette let kan beskadiges.

Fig. 62.



Cathcarts frysemikrotom.

Fig. 63.



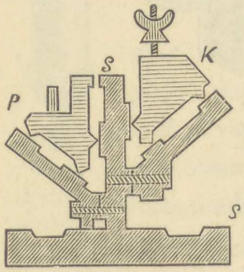
Jung's «Studentmikrotom».

Jung (Heidelberg) søger at undgaa denne ulempe ved at forene det Cathcartske objektbord med mekanisk knivføring (se fig. 63). Ogsaa dette instrument er billigt.

2. Rivets slædemikrotom bragte her de nødvendige forbedringer og danner udgangspunktet for flere af de nyere mikrotomtyper.

Rivets mikrotom (fig. 64) bestaar af en paa en vandret plade fæstet lodret staaende væg (S), paa hvis ene side der er fæstet en horizontalt liggende slæde, og paa den anden side en skraaslæde (med stigning 1 : 10 eller i de senere aar 1 : 20) parallelt med horizontalslæden. Præparatet (P) fæstes i en klemme, som vandrer støt i skraaslæden, medens kniven skrues fast til en i horizontalslæden vandrende blok (K). Idet præparatet for hvert snit forskyves bortover skraaslæden, løftes det lidt op og frembyder nyt snit for kniven.

Fig. 64.



Rivet-Leisers mikrotom i tværsnit. P præparatblok, K knivblok, S stativ.

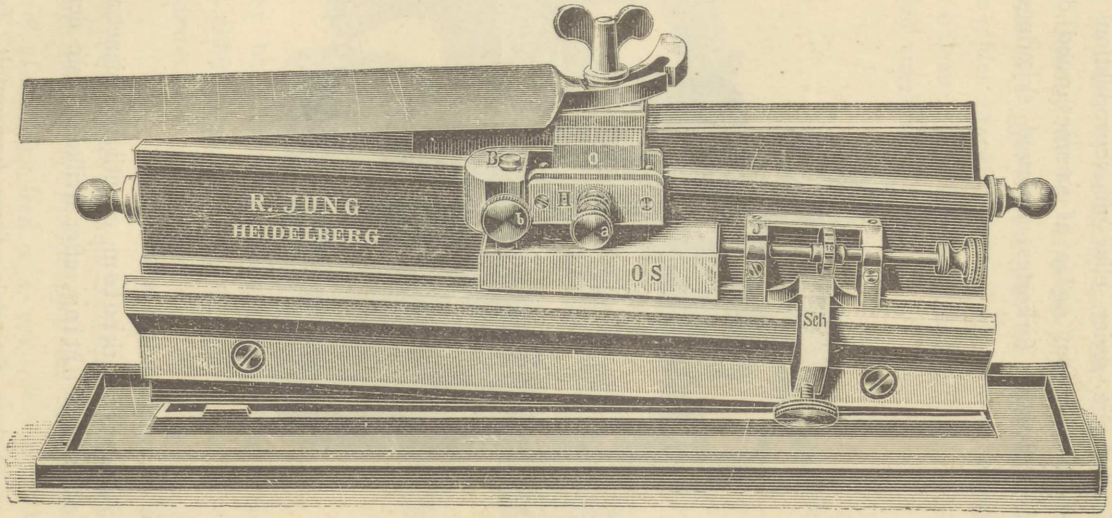
Den oprindelige Rivets mikrotom var dog et ufuldkomment instrument, den var af træ og lidet nøiagtig arbeidet, men gjennem modifikationer saavel af selve mikrotomen som af kniven er den efterhaanden bragt til en stor fuldkommenhed. Gangens nøiagtighed er forøget ved at de klodse, hvortil præparat og kniv er fæstede, kun glider mod slæden paa enkelte punkter istedetfor som før med sine hele sider. For at gjøre præparatets føring (og dermed snittykkelsen) jevnere og nøiagtigere drives præparatet nu ikke længere op over skraaslæden med haanden alene, men ved hjælp af en skrue med inddelt krave, saa at høidedifferencer af ned til 0,001 mm. kan aflæses.

Ogsaa ved kniven gjordes forbedringer, dels saaledes at den for frembringelse af fine snit nødvendige skraastilling kunde opnaaes, dels ved at dreie bladet, saa kun eggen rørte ved præparatet under skjæringen.

Efter de forskjellige forbedringers ophavsmænd benævnes denne mikrotom gjerne Rivet-Leisers, R.-Brand, R.-Thomas's o. s. v., i den senere tid vel oftest Jung's mikrotom efter det fremragende instrumentmagerfirma, der har gjort fabrikationen til en specialitet.

Rivets mikrotom er i sin nuværende skikkelse et særdeles fint instrument, der tillader skjæring af seriesnit endog ned til 0,003 mm., ja derunder.

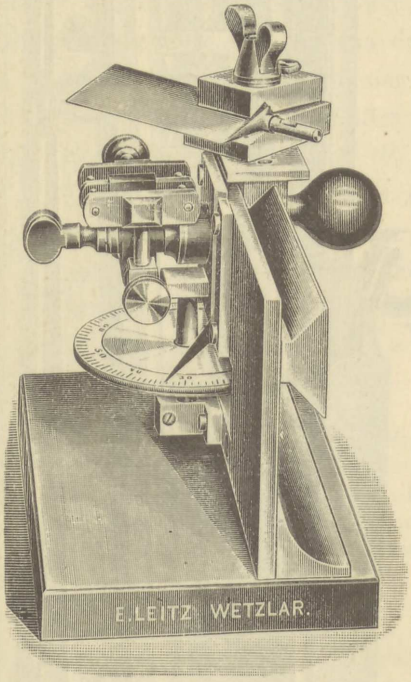
Fig. 65.



Rivet-Leisers, «Jungs» mikrotom.

Imidlertid har konstruktionen den ulempe, at præparatet under skjæringen stadig fjerner sig fra den arbeidende, hvad der især ved lange serier eller masseproduktion af snit kan blive generende, ligesom ogsaa af samme grund den til knivføringen frie distance forkortes, hvorved skjæringen ligeledes vanskeliggjøres.

Fig. 66.



Schanzes Support-mikrotom.

Disse ulemper undgaaes ved

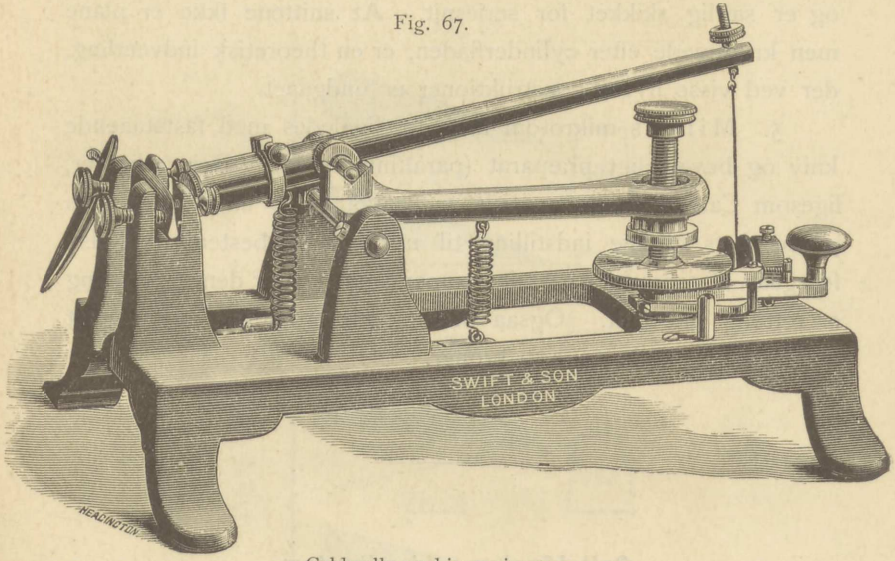
3. Schanzes mikrotom, egentlig foreslaaet af Weigert, men forbedret af Kørting, efter hvilken sidste den ogsaa ofte benævnes.

Medens kniven fremdeles føres horizontalt, fæstes præparatet her til en slæde, der vandrer lodret op og ned ved hjælp af en mikrometerskrue. Selve præparatklemmen — og dermed

præparatet — kan ved to lodret paa hinanden staaende akser stilles i alle ønskelige planer. Mikrometerskruen er forsynet med krave, hvorpaa en inddeling, saa snittykkelsen kan aflæses.

Ogsaa denne form har flere modifikationer. Knivblokken anbringes saaledes gjerne fast paa en «dovetailed» list, paa hvilken den glider istedetfor i en slæde. Den kaldes da supportmikrotom. Knivblokken drives da ofte ved hjælp af en skrue med stærk stigning.

Fig. 67.



Caldwells rocking microtome.

Becker har konstrueret en mikrotom, hvor knivblokken vandrer paa elfenbenspidser i en slæde af speilglas. Samtidig løftes præparatet ved en mekanisme, der har parallelogrambevægelse.

Saavel Rivet-Leisers som Schanze-Weigerts mikrotomer udstyres med talrige hjælpeapparater, snitstrækkere, automatisk kontrol af snittykkelsen o. s. v.

Af andre mikrotomkonstruktioner kan nævnes

4. Caldwells rocking microtome, ogsaa kaldet Cambridge microtome.

Ved denne staar kniven (en almindelig barberkniv) ubevægeligt stille, medens præparatet er fæstet paa enden af en toarmet vægtstang, ved hvis bevægelser det føres ned mod eggen. Idet denne vægtstangs omdreiningspunkt ved en særegen mekanisme, ligeledes baseret paa vægtstangsprincipet, efter hvert snit bringes fremover mod eggen, byder der sig stadig nyt snit for denne. Caldwells mikrotom arbeider meget let og fint, men egner sig næsten udelukkende for paraffinpræparater og er særlig skikket for seriesnit. At snittene ikke er plane men krummede efter cylinderfladen, er en theoretisk indvending, der ved visse nyere konstruktioner er undgaaet.

5. Minots mikrotom arbeider ligeledes med faststaaende kniv og bevægeligt præparat (paraffinindleiret). Den arbeider, ligesom Caldwells, automatisk ɔ: saavel selve skjæringen som præparatets stadige indstilling til nyt snit af bestemt tykkelse foregaar af sig selv ved mikrotomens gang, naar denne en gang er rettelig indstillet. Ogsaa Minots mikrotom er særlig egnet for seriesnit. Pris ca. 170 kroner.

Snitskjæring med mikrotom.

Uagtet føringen saavel af kniv som af præparat ved de nyere mikrotomer foregaar paa mekanisk vei, fordrer dog brugen af mikrotom adskillig omsigt og øvelse, om de bedste resultater skal erholdes.

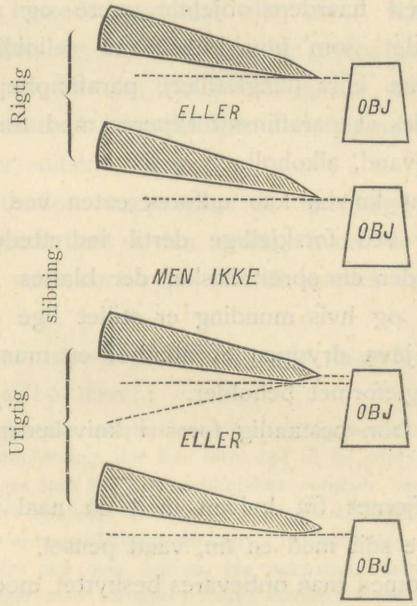
En forhaandsbetingelse er, at selve præparatet egner sig til skjæring, hvad enten det nu blot er paaklæbet præparatklemmen, indeklemt i en eller anden masse eller indstøbt i celloidin resp. paraffin.

Dernæst maa kniven være skarp, af rigtig form og vel holdt. Særlig bør det paasees, at eggen, naar man sigter hen-

over den, er absolut retliniet baade i horizontal- og vertikalplanet, da snittene ellers blir uregelmæssigt bølgede eller sønderrevne.

Kniven bør renses og afpudses grundigt og forsigtigt efter hver gangs brug. Man faar liden respekt for arbeidets omhyggelighed og finhed, hvor man ser mikrotomkniven forblive staaende upudset i mikrotomen efter endt arbeide. Pudsningen udføres med en blød linfille fra ryg mod eg, hvilken sidste ikke

Fig. 68.



berøres. Den sidste afstrygning kan ske paa haandryggens fine hud — NB. renvasket og tør.

Før hver ny benyttelse af kniven gives denne en let strygning paa strygerem omtrent som en barberkniv (Zimmers remme anbefales). Strygeremmen bør ligge paa fast underlag og kniven føres saaledes, at dens underflade under strygningen ligger plant paa remmen, medens knivryggen, naar oversiden stryges,

reises lidt op. Herved fremkommer en egg af rigtig profil med facet paa oversiden. Er strygeremmen blød og eftergivende, vil eggen blive lidt afrundet, og holdes kniven steilt ogsaa ved strygning af underfladen, vil der ogsaa fremkomme en facet her. I begge de sidste tilfælde vil man ikke uden en meget skraa stilling af kniven i mikrotomen undgaa, at objektet trykkes af den underste facet (se fig. 68).

En god og velsleben mikrotomkniv maa bevares som en helligdom.

Kniven stilles ved blødere objekter mere parallelt med slæderetningen, ved haardere objekter mere og mere tværs. Ellers gjælder det som hovedregel, at celloidinpræparater skjæres med skraa kniv (langsstillet), paraffinpræparater med tværstillet, ligeledes at paraffinsnit skjæres med tør, alle andre med fugtig kniv (vand, alkohol).

Fugtningen af kniven kan udføres enten ved hjælp af en bred pensel eller ved forskjellige dertil indrettede apparater. Weigert anvender en sprøiteflaske, der blæses gjennem en koutschoukslange, og hvis munding er stillet lige over kniven. For at sikre en jevn dryppen af alkohol er mundingsstykket udblæst til en kugleformet beholder.

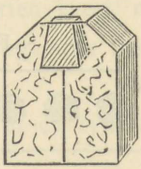
Knivblokken bør bestandig føres i knivslæden uden tryk med haanden.

Paraffinsnit fjernes fra kniven med en naal eller en fin pincet, alle fugtige snit med en fin, vaad pensel.

Selve mikrotomen maa opbevares beskyttet mod støv, syredamp osv., f. eks. under glaslaag eller i særegen kasse. Aftørres vel efter hver gangs brug. Oljes kun ubetydeligt.

Ved præparater indeklemt i lever, gulrod, hyldemarv o. l. maa støttemassen for størstedelen fjernes oppe ved snitfladen ved skraasnit med en skarp kniv, forat ikke den brede bræm af støttemassen skal skade selve præparatsnittene, naar de samtidig løsnes af kniven (se fig. 69).

Fig. 69.



Saadanne præparater fugtes bedst i den vædske, hvori de før har været opbevaret.

Præparater i celloidin skjæres enten direkte fastskruede i mikrotomens præparatklemme eller fæstede paa kork eller træ. Kniven sættes som regel langsstillet, og baade denne og præparatet fugtes rigeligt med alkohol af 80—82 %, hvori ogsaa snittene kan opbevares uden skade. Overflødige celloidinmasser fjernes med skarp kniv før snitskjæringen.

Det er stundom nødvendigt at undersøge en hel del efter hinanden følgende snit i den orden, hvori de fremkommer — snitserier, snitrækker. Hertil kræves særlige fremgangsmaader.

Weigert har angivet følgende methode for snitrækker i celloidin:

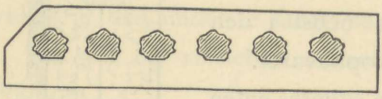
Et antal objektglas overhældes hver for sig med en ganske tynd og letflydende celloidinopløsning, der faar tørre ind til en yderst tynd hinde.

Snittene tages bort fra mikrotomknivens overflade ved hjælp af en ca. 20 cm. lang og efter snittenes tværmaal 1—2—3 cm. bred strimmel glat tyndt papir (closetpapir er meget hensigtsmæssigt). Papiret holdes stramt mellem begge hænder og trækkes ned over kniven, saa præparatet hefter sig derpaa. Paa denne vis anbringer man snittene i række henover disse strimler, som mellem hvert snit henlægges i en skaal, hvis bund er dækket med 3—4 lag i 80 % alkohol stærkt fugtet trækpapir. Naar det forønskede antal snit er naaet, lægges papirstrimlen med snittene nedad paa et af de præparerede objektglas for at faa snittene til at fæste sig. Fingeren stryges over papiret med et let tryk, og papiret løftes under skarp bøining forsigtig op, saa snittene blir liggende tilbage. Den vandholdige alkohol fjernes ved forsigtig overgydning med nogle draaber A + A, hvorpaa de overhældes med tynd celloidin, saa snittene ligger ganske omgivne heraf. Naar dette celloidinlag er tørret, lægges hele objektglasset et øieblik i 80 % alkohol, og alle de i celloidin indesluttede snit kan nu tages af som en sammenhængende hinde, der efter ønske farves og viderebehandles paa forskjellige maader. Hinden hænger meget fast til objektglassets kanter, afløsning

gaar derfor lettest for sig, naar der udskjæres en lap midt paa glasset. Ved et skraasnit eller andet merke i det ene hjørne betegner man sig, hvor rækken begynder (fig. 70).

Man kan ogsaa (Siemers) skjære celloidinsnittene i 96 % alkohol og ordne dem direkte paa det med en tynd celloidinhinde overtrukne objektglas hvorefter alkoholen aftørres med filtrerpapir; man holder saa glasset et øieblik over halsen paa en ætherflaske, de deraf opstigende dampe vil fæste snittene til underlaget. De kan da farves og monteres saavel i glycerin som i kanadabalsam.

Fig. 70.



Skematisk snitrække i celloidin (Weigert).

En tredie maade er følgende: Efter indstøbningen i celloidin hærdes stykket ikke i 82 % alkohol, men i chloroform. Her blir det ganske hvidt, ugjennemsigtigt og temmelig haardt. Det opklares derefter ved at lægges i origanumolje (eller bergamotolje), hvorved det blir gjennemsigtigt. Det kan nu skjæres, og snittene, der ikke trænger yderligere behandling (deshydrering), ægges i række paa objektglasset, hvorpaa de indleires i kanadabalsam. Methoden egner sig bedst til gjennemfarvede snit.

Paraffinpræparater skjæres altid med tør kniv. Som regel stilles denne ganske tværs paa snitretningen, kun ved meget store eller haarde præparater i skraastilling.

Skjæringen bør foretages i en for den anvendte paraffins haardhed (ɔ: smeltepunkt) og objektet afpasset temperatur. Er denne for kold (eller paraffinen for haard), krøller snittet sig gjerne op, er det for varmt (eller paraffinen for blød), trykkes snittene gjerne sammen af kniven.

Snittene fjernes fra kniven med en naal eller en fin pincet.

Snitrækker i paraffin opnaaes bedst ved de saakaldte snitbaand («bændelormsnit»).

Den til indstøbning anvendte paraffin maa være nogenlunde blød; hvis den er haard, lægges den hele blok ned i lidt letsmeltelig paraffin, saa den omgives med et blødt lag. Paraffinblokken tilskjæres derefter saaledes, at den mod undersøgeren vendende side og den modsatte begge er parallele med den tværstillede knivseg.

Snittet udføres hurtigt, og idet nu de enkelte snit klæber sammen kant i kant, opstaar lange bændelormlignende baand

(«bændelormsnit»), hvori de enkelte led kommer i samme rækkefølge, hvori de er skaarne.

Uden at et eneste snit gaar tabt, kan endog forholdsvis store gjenstande fuldstændig opkløves, f. eks. foetus o. l. i ubrudte snitrækker, («lückenlose Schnittserien»), og methoden er af uvurderlig værdi for saavel embryologi som histologi i det hele taget.

Naar alle forhold er gunstige, kan snitrækker af en tykkelse af ned til 5 μ paaregnes.

Har snitbaandet naaet en vis længde, opkløves det i mindre grupper afhængig af størrelsen af det dækglas, under hvilket det skal lægges, og monteres saa paa objektglasset.

Man staar sig i regelen paa at skjære op længere baand ad gangen.

Paraffinsnit maa oftest ved særegne midler fæstes paa objektglasset og befries for det vedhængende paraffin, før de indleires under dækglas. Alt efter som de paa objektglasset skal behandles med farveopløsninger og andre vandige vædsker eller med alkoholiske stoffe, blir fremgangsmaaden noget forskjellig.

Der er angivet en utallighed af methoder, af hvilke følgende vel er de mest bekjendte og benyttede:

For paraffinsnit, der ikke skal farves eller anderledes behandles, anvendes gjerne

a. Flögels gummiopløsning.

1 draabe almindelig gummiopløsning udrøres med nogle kubikcentimeter vand i et uhrglas. Af denne opløsning stryges med en pensel et ikke for tyndt lag paa objektglasset. Snittene lægges herpaa efterhvert som de tages af kniven (de bør saavidt kunne flyde paa vædskens overflade), hvorefter objektglasset forsigtig opvarmes over en flamme, vandbad eller lignende. Herved udglattes de ofte noget krumme eller ujevne snit godt og hurtigt. (Er snittene paa forhaand ganske smaa og glatte, kan man først lade gummiopløsningen indtørre og lægge snittene ovenpaa, efterat man ved at aande derpaa har gjort gummien let klæbende). Naar gummiopløsningen ganske er fordampet, hvilket maa ske langsomt, ved at ligge over til næste dag, selvfølgelig beskyttet mod støv, opvarmes glassene forsigtigt over en flamme, til paraffinen smelter. Den smeltede

paraffin skylles bort med xylol, hvorefter kanadabalsamen straks tilsættes, før præparatet tørrer.

Denne methode tillader ikke farvning af snittene paa objektglasset eller anden behandling med vandige opløsninger, der naturligvis vil opløse gummien og skylle præparaterne bort.

Skal præparaterne farves paa objektglasset, fæstes de med

b. Schällibaums nellikolje-kollodium.

En blanding af nellikolje (4 dele) og kollodium (1 del) stryges med en pensel jevnt udover objektglasset; snittene fæstes herpaa. Nellikoljen opløser paraffinen, og begge fjernes ved let opvarmning over en flamme samt udvaskning med xylol, hvorefter de kan bedækkes med kanadabalsam og dækglas.

Skal snittene farves paa objektglasset, hvortil de holdes fæstede ved det tynde kollodiumlag, afvaskes xylolen hurtigt med absolut alkohol, hvorefter farven hældes over, eller hele objektglasset lægges i farvevædsken. Enkelte anilinfarver, f. eks. vesuvin, egner sig her mindre, da ogsaa kollodiumkanten farves stærkt med.

c. Mayers albumin-glycerin.

50 gr. æggehvide,
50 gr. glycerin og
1 gr. salicyl. natr.

rystes godt sammen og filtreres.

Vædsken pensles ud paa objektglasset, og snittene bredes ud derpaa, varmes over vandbad, til paraffinen smelter og albuminen koagulerer. Samtidig udskilles glycerinen i draaber. Udvaskes godt med absolut alkohol.

Kan efterfarves med al slags farver, ogsaa aniliner.

d. Gulland-Nusbaums snitopklæbning med vand.

Paa det omhyggeligt rensede objektglas udbredes en rigelig mængde vand ved hjælp af en glasstav. Snittene lægges paa vandet og opvarmes over flammen, indtil de er ganske glatte. Paraffinen maa ikke smelte. Vandet afhældes forsigtigt, saa snittene ikke glider af. Derefter sættes objektglasset paa kant under en glasklokke 24—36 timer til fuldstændig tørring. Snittene kan nu farves og behandles som man vil; er methoden ordentlig udført, hænger snittene godt fast ved kapillærattraktionen.

Farvning.

Den mikroskopiske farvning har til formaal at adskille (differentiere) de forskjellige vævsdele fra hverandre, ved hjælp af deres forskjellige evne til at optage de forskjellige farvestoffe (elektiv evne, elektion).

Ved denne farvestoffets optagelse i og forening med vævselementerne gjør saavel fysiske (osmose, overfladeattraktion) som især kemiske forhold sig gjældende.

Levende væv eller saadant, der ikke har været underkastet særlig behandling, lader sig kun undtagelsesvis farve (se dog methylgrønt, nervefarvning med methylenblaat, metalimpregnationerne). Farvestoffene optages i regelen kun af væv, der har undergaaet visse kemiske processer.

Endel farvestoffe optages med særlig forkjærlighed af cellekjærnerne — kjærnefarvestoffe. Andre farver optages mere jevnt baade af kjærner, protoplasma og mellemsubstans — diffuse farver.

Der synes at være en vis sammenhæng mellem farvestoffenes kemiske og fysiske egenskaber og deres egenskaber som vævsfarver.

Særlig for anilinfarvernes vedkommende har Ehrlich studeret dette nøiere. De fleste af disse farver er saltforbindelser, enkelte af dem syrer. I endel af anilinfarverne er basen det farvende princip, medens syren er forholdsvis ligegyldig (f. eks. saltsur eller ediksur anilin); i andre danner syren farvestoffet, og endelig er der nogle, hvor det hele salt har den farvende evne, hvor altsaa hverken syren eller basen kan forandres, uden at ogsaa farveevnen veksler.

Man har efter disse egenskaber delt disse farver i basiske, sure eller nøitrale farver, benævnelser, der altsaa ikke her maa forstaaes i sin vanlige kemiske betydning.

Som gjennemgaaende regel er de basiske og nøitrale farver udprægede kjærnefarvestoffe, de sure farver derimod diffuse.

Ogsaa i fysikalsk henseende synes der at være en gruppeforskjel, idet basiske og nøitrale farver (kjærnefarver) i saavel vandige som alkoholiske opløsninger vanskeligere opsuges ved kapillærvirkning. Tynde opløsninger af disse spaltes endog ved kapillærkraften saaledes, at kun opløsningsmidlet opsuges, medens farvestoffet bliver tilbage. Opløsninger af de sure (diffuse) farvestoffe derimod opsuges meget let ved kapillærvirkning og spaltes ikke derved selv i meget tynde opløsninger.

Ved at anvende to eller flere farver med forskjellig «affinitet» eller elektiv evne kan man frembringe dobbeltfarvninger eller flerdobbelte farvninger. Disse kan enten udføres efter hverandre eller i et tempo, idet vedkommende objekt behandles med en blanding af farverne; hver af disse forbinder sig da med den specielle vævsdel, hvortil den har størst affinitet. Af saadanne dobbeltfarvninger bruges meget karmin-pikrinsyre, hæmatoxylin-eosin, hæmatoxylin-pikrinsyre og forskjellige anilinfarveblandinger.

Et og samme farvestof kan ogsaa med forskjellige vævsdele give forskjellige farver (kochenille, methylviolet ved amyloidreakt., methylgrønt); dette kaldes metakromasi, farveskiftning.

Selve farvningen af vævet kan udføres enten paa direkte eller indirekte maade.

a. Ved den direkte farvning tages objektet (snittene) op af farvevædsken, saasnart farven har slaaet sig ned i de vævsdele, hvortil den har størst affinitet (f. eks. kjærnerne), men førend de øvrige dele er farvede. Denne maade kaldes ogsaa den afbrudte farvning (Lee & Henneguy). Den kan udføres langsomt i meget tynde farveopløsninger eller hurtigt i mere koncentrerede. Man kan her gjøre udvælgelsen skarpere ved at tilsætte en syre (eddiksyre 1—2 %, osmiumsyre 0,1—1,0 %), der hindrer, at farvestoffet slaar sig ned i protoplasma og bindevæv.

b. Ved den indirekte farvning udsættes vævet, snittene, først for en mere eller mindre stærk overfarvning, hvorefter de atter affarves, indtil farvestoffet kun fastholdes af bestemte vævsdele. Dette er altsaa en afbrudt affarvning (Lee & Henneguy).

Affarvningen kan foretages med en hel række stoffe: alkohol, syrer, anilinolje, sure eller basiske anilinfarver (se nedenfor: Substitution), salte, iod, krom, klor, samt ved oxyderende og reducerende stoffe (SO_2, H_2O_2, hypermang. kali). Ofte anvendes flere af disse stoffe samtidig (saltsyrealkohol).

En herunder hørende meget almindelig anvendt methode er den Böttcher-Hermanns eller Flemmingske methode, der udføres saaledes:

1. Snit lægges 5—10—30 minutter i en mættet opløsning (3—4 %) af en kjærnefarvende anilinfarve (methylgrønt, methylviolet, fuchsin, saffranin) tilsat med 0,5—1 % eddiksyre eller 0,1—0,5 osmiumsyre.

2. Affarves i stærk (96 %) alkohol, hvortil der kan sættes 1 % fortyndet saltsyre 25 %, hvori farvestoffet afgives i store skyer.

3. Naar affarvningen er færdig (præparatet skifter farve, vævstegningerne begynder at blive synlige), afbrydes processen straks, og syrealkoholen udskylles hurtigt og grundigt i ren alkohol.

Man maa vogte sig for at affarvningen gaar for langt; der bør heller ikke blive noget spor af syren tilbage i præparatet. I begge tilfælde vil dette være ødelagt.

Som ovenfor nævnt, kan affarvningen ogsaa ske ved hjælp af en anden farve, der jager den første delvis bort og indtager dens plads. Denne methode, affarvning ved substitution, omfarvning, kommer især til anvendelse ved anilinfarverne (og ved hæmatoxylin). Den er mere skaansom mod vævet, der her ikke paavirkes af de stærkt indvirkende syrer. Affarvningen afbrydes, naar den første farve er uddrevet af protoplasmaet og intercellulærsubstansen, men endnu holder sig i kjærnerne. Paa denne maade opstaar ogsaa en dobbeltfarvning ved substitution.

For anilinfarvernes vedkommende har Resegotti fundet, at følgende substitutioner gir de bedste resultater:

I.		II.
Methylviolet substitueres af	. . . .	Eosin.
Gentianaviolet Dahlia (blaat)	. . . . .	Fluoresceïn. Syrefuchsin.
Fuchsin Saffranin (rødt)	. . . . .	Methylgrønt. Methylenblaat. Nigrosin (blaasort).

Affarvningen ved substitution kan yderligere befordres ved, at sekundærfarven opløses i et stof, der i og for sig udtrækker primærfarven, f. eks. alkohol, nellikolje eller syrer.

c. I visse tilfælde er vævets farvning et resultat af mere sammensatte kemiske processer, idet foruden farvestoffet selv ogsaa andre stoffe bringes til at indvirke paa vævet, saa der ved udfældninger af nye stoffe (reduktioner, oxydationer) dannes nye forbindelser med særegen affinitet til de enkelte vævsdele eller særegne opløselighedsforhold. Disse sammensatte kemiske farvninger har gjerne karakteren af specifike farvninger, saaledes Grams bekjendte farvning af mikroorganismer (methylviolet — iod), Weigerts myelinfarvning (hæmatoxylin — krom — kobber) o. s. v..

De fleste farvestoffe anvendes i vandig opløsning, enkelte ogsaa i alkoholisk opløsning eller med tilsætning af alkohol, som letter farvestoffets indtrængning i vævet, særlig hvor dette før farvningen har været imbiberet med alkohol. De vandige opløsninger kan ogsaa i fine strukturer, som kommer direkte fra alkohol, fremkalde forrykkelse af vævselementerne paa grund af de heftige diffusionsstrømme mellem de to vædsker.

Farvningerne foretages dels paa snit, dels paa større stykker før skjæringen: farvning «*en bloc*» eller «*en masse*». Netop ved disse stykfarvninger anvendes helst alkoholiske farveopløsninger paa grund af deres større evne til at trænge igjennem vævet. Ogsaa den differentierende affarvning — f. eks. med HCl alkohol — foretages da med det hele stykke. Begge processer tager naturligvis længere tid end den tilsvarende behandling af snit — i regelen 12—24 timer. Differentieringsvædsken bør skiftes flere gange, og stykket ophænges gjerne i samme ved en traad eller i et stykke fint tøi, saa den udtrukne farve kan synke tilbunds i glasset.

De fleste farvninger, tinktioner, udføres med stoffe af organisk natur (karmin, hæmatoxylin, orceïn, anilinfarver); farvning med anorganiske forbindelser, især metaloxyder og salte, osmiumsyre, salpetersurt sølvoxyd, guldklorid o. s. v. kaldes impregnationer.

Alle mikroskopiske farvninger er af forholdsvis ny datum. Først indførtes karmin, der endnu er det mest benyttede, i 1858 af Gerlach, hæmatoxylin 1863 af Böhmer, anilinfarverne ligeledes 1863 af Waldeyer. Af metalfarvninger anvendtes først salpetersurt sølvoxyd 1854 af Flintzer, senere mere udbredt af His og Recklinghausen.

Karmin.

Dette farvestof udvindes af skallerne af den paa forskjellige kaktusarter levende kochenillelus (coccus cacti). Man antog tidligere, at det farvende princip heri var karminsyren, men efter Paul Mayers undersøgelser er karminets histologiske farveevne knyttet til en forbindelse af karminsyren med aluminium — et alunkarminat (karmalun), hvortil i den almindelige karmin ogsaa kommer kalk, klornatrium og organiske forbindelser.

Mayer har indført det rene karmalun til histologisk farvning i stedet for denne blanding af forskjellige stoffe.

Alunkarminatet, karmalun, er opløseligt saavel i syrer og sure, vandige eller fortyndede alkoholiske saltopløsninger (alunopol.) som i alkalier og alkaliske saltopløsninger (borax).

Der gaar i handelen karmin til mange forskjellige priser. Man staar sig altid paa at bruge en god — og dyr — sort. (Naccarat-karmin.)

Mayers karmalun

Karminsyre	1
Alun	10
opløses i	
Vand	200

under ophedning; filtreres, tilsættes noget thymoloxyl efter afkjølingen for holdbarhedens skyld.

Karmalun kan ogsaa faaes færdigt i handelen.

Egner sig særlig til farvning en bloc, men ogsaa til snit. Udvaskning i vand, hvorved protoplasmaet beholder et rødligt skjær, eller hvis dette ønskes undgaaet, i en alunopløsning eller en svag syre. De væv, som skal farves, maa ikke have alkalisk reaktion.

Grenachers alunkarmin

Karmin	1
Alun (kali ell. amm.)	3
Vand	100

koges 20 minuter, afkjøles og filtreres. Tilsættes om ønskes lidt thymol eller karbolsyre for holdbarhedens skyld.

Meget skarp kjærnefarvning.*

Snit farves i 3—5 minuter, men selv ved langt ophold i vædsken blir der ingen overfarvning. Udvaskes i vand eller 70 % alkohol nogle minuter. Egner sig ikke til farvning en bloc.

Farven opløser kalk og kan derfor bruges til fin dekalcinering, men maa undgaaes til væv, hvor kalkbestanddele ønskes bibeholdt.

Partschs alunkochenille

Kochenille	7
Alun	25
Vand	500

koges 20 minuter, afkjøles, filtreres, tilsættes lidt salicylsyre eller karbolsyre for at undgaa sopudvikling i vædsken.

Snit af alkoholhærdede præparater farves i ca. 5 minuter, af kromsyrehærdede i 4—5 timer.

Afvaskes i vand eller 70 % alkohol.

Alunkochenille farver metakromatisk ɔ: de forskjellige væv antager heri noget forskjellig farve. Kromatinen bliver blaaligrød, de andre vævsdele faar flere lysere nuancer. Epithel udpræges kraftigt.

Vignals pikrokarmin

(efter Lee & Henneguy)

Karmin	10
Pikrinsyre	20
Ammoniak	50
Vand	1000

hensættes 2—3 maaneder i lukket flaske paa et varmt sted. Hældes i en aaben skaal, hvor den forraadner og indtørrer til $^4/_5$ af det oprindelige volum, hvorefter de dannede pikrinsyre xxl. optages fra bunden. Vædsken indtørres nu fuldstændig i varmeskab, bundfaldet pulveriseres, 1 gr. pulver til 100 gr. vand giver hensigtsmæssig farvning.

Forraadnelsesprocessen maa fortsættes, til den filtrerede opløsning under mikroskopet ikke viser uopløste karminkorn. I saa tilfælde tilsættes paany vand og ammoniak, og processen fortsættes.

Denne pikrokarmin er en paalidelig modifikation af Ranviers.

God og skaansom cellefarvning, bindevævsfarve.

Pikrokarminer bør helst bestilles færdig i opløsning fra et velkjendt farvefirma.

Grenachers alkoholiske boraxkarmin

Karmin 3
Borax 4
opløses i
Vand 100
tilsættes
Alkohol 70 % . . . 100

hensættes til bundfældning 24 timer, filtreres (filtreringen maa oftere gjentages, saa vædsken altid bruges klar).

Egner sig fortræffeligt til farvning en bloc.

Stykker farves 6—12—24—48 timer, differentieres lige længe i ½ % saltsyrealkohol *, udvaskes i 70 % alkohol.

Maa stykket ligge mere end 24 timer i farven, bør denne gjøres stærkere alkoholisk — op til 50 %. Ligeledes kan differentieringen udføres skaansommere i tyndere saltsyrealkohol, ca. 2 ‰ (Lee & Henneguy) eller i pikrinsyrealkohol tilsat 1 draabe saltsyre pr. 100 cc. (Lee).

Grenachers alkoholiske boraxkarmin kan ogsaa bruges efter fixation i Flemmings vædske.

Vil man ganske undgaa differentiering i HCl-alkohol, kan man bruge

Nikiforows boraxkarmin

Karmin 3
Borax 5
Vand 100

koges og afkjøles. Der tilsættes ammoniak til kirsebærrød farve og fuldstændig klar vædske. Inddampes til det halve volum, hvorefter der tilsættes $\bar{A}$ til kirsebærfarven svinder; vædsken et da tyk, maa være lugtløs.

God til farvning en bloc ogsaa af præparater fixerede i osmium- eller kromsyre.

Udvaskes blot i vand.

Orths lithionkarmin

Karmin 2.5
opløses i mættet
vandig opløs-
ning af
Kulsurt lithion . . . 100.00

1. Snit farves i 5—10 minuter, men kan uden fare for overfarvning ligge i 24 timer.

---

* Saltsyrealkohol: 100 cc alkohol 70 % + 1 cc saltsyre 25 %.

2. Udvaskes hurtigt i vand.
3. Differentieres i 1 % saltsyrealkohol.
4. Udvaskes i 70 % alkohol.

Er en letvindt og vakker farve, let at tilberede og meget holdbar; er dog mindre precis som kjærnefarvning.

Karminsur natron

til farvning af Purkinjes celler i den lille hjerne.

Karminsur natron . 100
opløses i
Vand 1000

Stykker af den lille hjerne, ikke over 0.5 ctm., hærdede i MV *), efterhærdede i alkohol, farves heri 3 dage. Udvaskes i 70 % alkohol 2—3 dage. Skjæres.

Schwans urankarmin

til farvning af aksecylindre.

Karminsurt natron . . 1
Uranum nitr. 0.5
rives sammen i en
skaal, koges ½
time i
Vand 100

afkjøles og filtreres.

Snit af rygmarv eller nerver hærdet i Müllers vædske og efterhærdet i alkohol (i mørke) uden foregaaende afvaskning i vand, farves 15—20 minuter (kan ligge i farven op til 24 timer).

Udvaskes i vand eller alkohol, kanadabalsam.

Mayers mucikarmin

til slimfarvning.

Karmin 1
Tørt kloralluminium 0.5
blandes i en porcelænsskaal med
Vand . . . . . 2 cc

ophedes under omrøren forsigtig et par minuter til seig konsistens og mørk farve. Derpaa udskylles indholdet med 50 % alkohol indtil 100 cc, hensættes 1—2 døgn, filtteres.

Ved brugen fortyndes denne meget holdbare stamopløsning til ddt 10-dobbelte (kun meget smaa mængder ad gangen) med kalkholdigt vand.

Farver kun slim rødt, vævet forøvrigt ufarvet, undtagen ved tilstede værelsen af fri syre, som da maa neutraliseres ved tildrypning af 1 % dobbelt kulsurt natron.

*) MV = Müllers vædske.

Dobbeltfarvning af karminpræparater sker enten ved pikrinsyre eller ved indigokarmin.

1) Pikrinsyren meddeler fibrillært bindevæv, forhornede epitheler og celleprotoplasma en intens gul farve.

Den kan indbringes i præparatet enten samtidig med karminen (pikrokarmin, pikrolithionkarmin) eller under de senere trin af snitbehandlingen.

1. Dobbeltfarvning med pikrolithionkarmin.

Snittene lægges 5—10—15 minuter i:
Orths lithionkarmin (se s. 126) 1
Mættet vandig pikrinsyreopløsning 2
afvaskes hurtigt i vand,
differentieres hurtigt i saltsyrealkohol (1 %), hvori er tilsat nogle pikrinsyrekrystaller til gul farve,
udvaskes i 70 % alkohol.

2. Pikrinsyren kan ogsaa indbringes i præparatet opløst i den 70 % vaskealkohol,

3. i den absolute alkohol (benzinalkohol), hvormed præpararet deshydreres, eller

4. opløst i den ætheriske olje, hvori præparatet opklares for indleiringen i kanadabalsam. I dette tilfælde sættes nogle faa draaber absolut alkoholisk pikrinsyreopløsning til den ætheriske opklaringsolje (se hæmatoxylineosin).

Pikrinsyrefarvningen bør ikke overdrives, farvevædsken bør kun have en lys gul farve. For stærk pikrinsyrevirkning kan skade kjærnefarvningen med karmin.

2) Indigokarmin i vandig opløsning (mættet opløsning ca. 10 gange fortyndet) giver fibrillært bindevæv, celleprotoplasma, røde blodlegemer, koaguleret albumin og kornsubstans en blaalig teint.

Karminfarvede snit lægges i vædsken 5—10 minuter og afvaskes i vand. En tyndere opløsning farver langsommere, men jevnere.

Egner sig godt til at fremhæve epithelløgene i kankroider.

Indigokarminen kan kombineres med pikrinsyre, vædsken blir da grøn.

Hæmatoxylin (Hæmateïn)

indførtes i den histologiske farveteknik af Böhmer i 1865. Det udvindes af blaafarvetræet, lignum campechianum, som bleggule eller gulbrune krystaller, der er opløselige i vand eller alkohol med en gulbrun farve. Disse simple opløsninger egner sig imidlertid ikke til histologisk brug, da de kun meddeler vævene en diffus gul farve. Som histologisk farvestof er hæmatoxylinen først anvendelig i forbindelse med alun og efter at farvestoffet er oxyderet («modnet») ved 6—8 dages henstaaen i luften, i hvilken tid den antager en mere og mere dybblaa farve. Ved denne oxydationsproces fremkommer et nyt stof, hæmateïn, som ifølge P. Mayer er det farvende princip i alle hæmatoxylinfarvestoffe. Dennes forbindelse med alun kaldes hæmalun.

Da hæmateïnets dannelse ved den sædvanlige «modning» foregaar sukcessivt og ustanseligt samt i ikke ringe grad er overladt tilfældet, er det forklarligt, at de tidligere brugte hæmatoxylinfarver kan have en usikker og vekslende samt ved længere henstaaen altfor voldsom farveevne, saa de maa afbleges.

Dette er søgt undgaaet ved at fremkalde en hurtig modning paa kemisk vei. Unna anvender til denne oxydation vandstofhyperoxyd, Hansen overmangansurt kali. Mest rationelt er det med P. Mayer at benytte sig af hæmateïnet selv, eller, da dette vanskeligt faaes rent i handelen, det omtrent lige godt farvende hæmateïn-ammoniak eller hæmateïnum crystallisatum.

For at stanse modningen, naar denne har naaet den passende grad, tilsætter Unna ca. $^1/_2$ % svovl til reduktion.

Hæmatoxylinerne anvendes væsentlig som kjærnefarvestoffe. P. Mayer antager, at farvningen beror paa en virkelig udfældning af hæmateïn-alunet i vævene og kemisk forbindelse med visse organiske og uorganiske salte, især fosfaterne.

Imidlertid farver visse hæmatoxyliner ogsaa diffust. Dette er tildels afhængigt af farvestoffets reaktion. De rødlige (sure)

hæmatoxyliner farver diffust, de rent blaa (godt neutraliserede) er skarpere kjærnefarvestoffe. Ved udvaskning med 1 % alunvand, dobbelt kulsurt natron i 1 ‰ opløsning eller længere tids udvaskning i almindeligt vandledningsvand vil en skarpere kjærnefarvning og en renere blaa farve fremkomme. Ved udvaskning i fortyndede syrer blir farven rødlig og mere diffus. Ogsaa ved overfarvning, som let indtræder ved alle hæmatoxyliner, kan en passende neutralisation opnaaes ved behandling med tynde syrer (fortyndet saltsyrealkohol).

Hæmatoxylinerne kan anvendes saavel efter alkoholhærdning som efter sublimat, kromsyre og osmiumsyre. Dog maa alle rester af sublimat være vel udvaskede for ikke at fremkalde farvede nedslag, ligesom indvirkningen af Cr og Os ikke maa have været for langvarig.

Hæmatoxyliner til almindelige farvninger.

Böhmers hæmatoxylin.

Den oprindelige forskrift lyder saaledes:

Hæmatoxylin . . .	1	A
Absolut alkohol .	12	A
Alun	1	B
Vand	320	B

Et par draaber af opl. A hældes i et uhrglas omtrent fuldt af opl. B; den herved fremkomne blaaviolette vædske maa modnes ved henstand.

Böhmers hæmatoxylin kan dog ogsaa holdes færdig til øieblikkeligt brug, idet vædskerne A og B hældes sammen og modnes i en aaben krukke beskyttet mod støv i ca. 14 dage.

Alkoholhærdede snit farves i 3 à 4 minuter, kromsyrehærdede i 3 à 4 timer.

Udvaskning i 1 % alunvand, derefter i 70 % alkohol.

Delafields hæmatoxylin.

Hæmatoxylin 1
opløses i
Absolut alkohol 10
blandes med
Mættet vandig ammoniak-alun-opløsning 100
Blandingen modnes 8 dage i aaben flaske; dernæst tilsættes
Glycerin . . . . . .
Methylalkohol 25

Hensættes til fortsat modning 6—8—10 uger. Filtreres. Den nu dybblaa farve er meget holdbar, farver kjærner precist, men ogsaa protoplasmabestanddele. Maa før brugen fortyndes til det 6-dobbelte volum.

Snit farves i 3—5 minuter, udvaskes i 1 % alunvand.

Mayers hæmalun.

Hæmateïn (hæmateïn-ammoniak) . 1
opvarmes med
Alkohol 90 % 50
Derefter tilsættes
Vandig alunopløsning 5 % 1000

Afkjøles, filtreres. Tilsættes en thymolkrystal. Vædsken rødviolet (efter alunens reaktion).

Kan bruges straks, saavel fortyndet med en svag alunopløsning som ufortyndet. God til farvning en bloc.

Snit farves næsten øieblikkeligt i den ufortyndede vædske.

Udvaskes i almindeligt vand.

Til opklaring før indleiring i kanadabalsam bør bruges terpentin, xylol, benzol eller kloroform, ikke bergamot eller nellikolje, der afbleger farven.

Dobbeltfarvning med karmalun eller syrefuchsin i to tempi.

Mayers sure hæmalun.

Mayers hæmalun . . . 100
Iseddik 2

Anvendes som hæmalun. Farver kjærner meget skarpt, særdeles holdbar. Udvaskning i alunvand.

Ehrlichs sure glycerin-hæmatoxylin.

Hæmatoxylin . . . 1
Vand
Absolut alkohol
Glycerin . . ana 50
Acid. acet. glac. . 5
Alun i overskud.

Modnes i 8—14 dage, til vædsken har faaet en dyb rød farve. Opbevares i vel korket flaske.

Snit farves i 3—5 minuter; egner sig ogsaa til gjennemfarvning i 24 timer, da overfarvning ikke finder sted, saa længe farven indeholder fri syre (holder sig rødlig).

Snit udvaskes 10—15 minuter, hele stykker 24 timer i vand, til den almindelige blaa hæmatoxylinfarve fremtræder.

Sanfelice's alkoholiske iod-hæmatoxylin.

Hæmatoxylin . . . . 0.70 } A
Absolut alkohol . . . 20.00 }

Alun . . . . . 0.20 } B
Destilleret vand . . 60.00 }

Opløsning A hældes langsomt i opløsning B, hvorved fremkommer en violetrød farvevædske. Denne hensættes i lyset, hvorunder farven blir mere mættet, tilsættes efter 3—4 dage eller mer 15—20 draaber sol. iodi spirit., rystes, hensættes til bundfældning.

Meget holdbar farve.

Egner sig godt til stykkefarvning.

Snit farves i 3—5 min.

Stykker farves i 12—24 timer.

Udvaskning i 90 % alkohol med lidt eddikesyre (stykker udvaskes 12—24 timer).

Overfarver ikke.

Efter fixation i Flemmings vædske, Os. osv. antager epithel, bindevæv og slimsubstans en pragtfuld himmelblaa, ganglieceller graa farve, naar snittene efter farvningen udvaskes i 70 % alkohol og derefter i en ganske tynd alkoholisk opløsning af eddikesur kali.

Hæmatoxylinfarvninger til specielle formaal.

Heidenhains kjærtelfarvning

med hæmatoxylin-kromsur kali.

Objekterne (smaa stykker) fixeres i pikrinsyre, alkohol eller sublimat, efterhærdes i alkohol. (Sublimaten maa fuldstændig udvaskes af stykket, da der ellers dannes mørkfarvede krystaller i vævet).

De fixerede og hærdede stykker farves 12—24 timer i $^1/_3$ % vandig hæmatoxylinopløsning, lægges saa 12—24 timer i $^1/_2$ % enkelt kromsur kaliopløsning.

Udvask i mørke i stigende alkoholer (70 %, 80 %, 90 %), gjennemstøb i paraffin, meget tynde snit!.

Farver i graa nuancer; skarpt tegnede kjærner, pepsinkjærtlernes delomorfe celler, spytkjærtlernes randcellekomplexer mørke, de andre lyse.

Weigerts nervefarvning (myelinfarvning)

(ældre methode 1885).

1. Stykker af hjerne, rygmarv eller nerver hærdes i 2 % (med eller uden formoltilsætning) dobbelt kromsur kaliopløsning (Müllers eller Erlickys vædske) til brun farve.
2. Efterhærdes i alkohol, indstøbes i celloidin, sættes paa kork eller træ.
3. Beises 48—72 timer, 37° C., i

   Mættet opl. acetas cupr. } lige dele.
   Vand }

   Stykket er da grønt, celloidinen blaagrøn.
4. Lægges 24 timer i 80 % alkohol, skjæres.
5. Snit farves i

   Hæmatoxylin . . 0.75—1
   Alkohol 10
   Vand 90

   Mættet vandig opløsning af kulsurt lithion.

   Snit af rygmarv og hjernens hvide substans farves i 2 timer, hjernens corticalsubstans op til 24 timer. I denne farvevædske omgives snittene af tykke masser af den udfældte farvelak.
6. Afvaskes i vand.
7. Affarves $^1/_2$—2—3 timer i

   Borax 2
   Ferricyankalium . 2.5
   Vand 200

   til fuldstændig differentieren.

   Den bedste differentieren faaes ved at anvende en noget tyndere opløsning i længere tid.

8. Udvaskes i vand. Myelin er blaasort, det øvrige væv brunt. Kan kontrafarves i vesuvin, karmin, eosin osv.
Indleires i kanadabalsam.

Weigerts nervefarvning (myelinfarvning)
(nye methode 1891).

1. Stykker af hjerne, rygmarv eller nerve hærdes i 2 % dobbelt kromsur kali (med eller uden formoltilsætning).
2. Efterhærdes i mørke i stigende alkoholer, indleires i celloidin, sættes paa kork.
3. Beises 24—48 timer (efter størrelsen) i 37 ° C. i
   Koldt mættet vandig opløsning af acet. cupr. } lige dele.
   10 % vandig Seignettesaltopl. }
4. Dernæst 24 timer i 37 ° C. i
   Koldt mættet vandig opløsning af acet. cupr. } lige dele.
   Vand }
5. Skylles i vand, opbevares i 80 % alkohol.
6. Snit farves i frisk tilberedt
   Mættet vandig opløsning af kulsur lithion . 7 } A 9 dele.
   Vand . . . . . 93 }
   Hæmatoxylin . . . . . 1 } B 1 del.
   Absolut alkohol . . . . . 10 }
   fra 4—24 timer i værelsetemperatur.
   Ikke for tykke snit.
7. Differentieres ved grundig udvaskning i vand; deshydreres, indleires i kanadabalsam.
   Giver en dyb sortblaa farve i myelinen, brunlig i vævet forresten.

Denne Weigerts myelinfarvning beror paa dannelsen af en krom-kobber-hæmatoxylin-lak, der med myelinen danner en i differentieringsvædsken uopløselig, med vævet forøvrigt en opløselig forbindelse.

Methoden er modificeret i forskjellige særformaal:

Pals modifikation af den Weigertske myelinfarvning.

1. Hærdning i Müllers vædske.
2. Efterhærdning i stigende alkoholer.
3. Indstøbning i celloidin.
4. Snit farves 5--6 timer i frisk tillavet
   Vandig hæmatoxylin opl. 0.75 % . 90
   Alkohol 10
   Mættet opl. af kulsurt lithion . . . 2

5. Afvaskes i tyndt lithionvand.
6. Affarves i 15—20—30 sekunder (ikke for længe!) i overmangansur kali (0.25 % opl.).
7. Udvaskes i vand.
8. Differentieres et par sekunder (ikke for længe!) i

Oxalsyre	1
Kalium sulphuros ($K_2 So_3$) . .	1
Vand	200

9. Udvaskes i vand.
10. Kontrafarves om ønskes i eosin, karmin osv. Indleires i kanadabalsam.

Pals methode giver en meget skarp og smuk blaalig farvning af myelinen, medens mellemsubstansen forbliver ufarvet. Den er ogsaa hurtigere end Weigerts methode, men kræver speciel behandling af de enkelte snit og nøie iagttagelse af den for affarvning og differentiering nødvendige korte tid. Snittene bør ikke i disse vædsker berøres af metalinstrumenter. Bedst er glasnaale.

Kultschitzkys hæmatoxylinfarvning af centralnervesystemet.

1. Friskt materiale hærdes i Müllers vædske.
2. Indleires i celloidin, skjæres.
3. Snit lægges 4—24 timer i

Sol. alkoh. hæmatox. 10 % .	10
Sol. acid. borici conc. . . .	20
Vand	80

et uhrglas fuldt, hvortil sættes 2—3 draaber eddiksyre, eller ogsaa i

Alkoh. hæmatox. 10 % .	10
2 % eddikesyreopl. . . .	100

Marvholdige nervefibre er da blaa, alt andet væv ufarvet.

4. Udvaskes 24 timer i mættet opløsning af lithion eller natron carb.
5. Indleires i kanadabalsam.

Wolters hæmatoxylinfarvning af aksecylindre, ganglieceller og nevroglia.

1. Friskt materiale hærdes 24 timer i

Sulphat. cupr. Bichrom. kal. opløses til mætning, koldt og i mørke i Alkohol 50 % Iseddik, 5—6 draaber pr. 100 cc vædske, tilsættes straks før brugen.	Kultschitzkys hærdningsvædske.

2. Efterhærdes 12—24 timer i alkohol 96 %, mørkt.
3. Indleires i celloidin, skjæres (5—10 μ).
4. Beises 10 minuter i

Sol vanadium chlorat 10 % . 2
Sol. acetat. alumin. 8 % . . . 8
udvaskes i vand.

5. Farves 24 timer, 45° C. (paa paraffinovn) i

Hæmatoxylin . . 2 (opl. i abs. alk.)
Eddikesyre 2 % 100
} Kultschitzkys sure hæmatox. opl.

6. Differentieres i ½ % saltsyrealkohol (prøver sig frem!).
7. Udvaskes i alkohol. Indleires i kanadabalsam.

Pyramideceller, Purkinjes celler med udløbere, aksecylindre og gliaelementer dybt blaasorte.

Bendas hæmatoxylin med jernsulfat for aksecylindre og cellens akromatin.

1. Hærdning i alkohol, sublimat, Flemmings vædske osv.
2. Indstøbes, skjæres.
3. Snit beises 24 timer i

Sulphas ferros . 80
Vand 40
Acid. sulphur . 15
Acid. nitric . . . 18
} = { Liqvor ferri Sulphurici oxydat. (Pharm Germ.) } . . 1
Vand 2

4. Udvaskes godt i destilleret vand.
5. Farves, indtil snittene er sorte, i vandig hæmatoxylinopl. (1 %).
6. Differentieres i eddikesyre (30 %). Man maa da nøie passe paa, at afarvningen ikke gaar for langt. Man kan fordelagtigt bruge en tyndere eddikesyreopl., eller ovenstaaende jernsulfatopl. stærkt fortyndet; begge differentierer langsommere og tryggere.
7. Udvaskes i vand.

Ved cellestudier anvendes kontrafarvning med tynd syrefuchsin.

(Benda)-Heidenhains hæmatoxylin med jernammoniumsulfat for cellestrukturer.

1. Fixation i sublimat, Flemmings vædske eller alkohol.
2. Indstøbning.
3. Snit beises ½—2—3 timer i en stærk

vandig opløsning af jernammoniumsulfat ($(NH_4)_2 Fe_2 (SO_4)_4$).

(Kun gjennemsigtige lysviolette krystaller kan bruges hertil, ikke de gamle gule og uklare. Vædsken maa opbevares godt korket.)

4. Skylles i vand.

5. Farves $^1/_2$—2 timer i

vandig hæmatoxylinopløsning $^1/_2$ %.

6. Ny udvaskning i vand.
7. Differentieres i ovenomtalte jernammonium-sulfat-opløsning fra 20 minuter og mere. Kontrol under mikroskopet.
8. Grundig udvaskning i vand fra 15—30 min., ikke over 1 time.
9. Indleires i kanadabalsam.

Ovenstaaende fremgangsmaade giver en skarp blaa farvning af alle kjærneelementer, kromatiske og akromatiske. Lader man beisningen og farvningen vare i længere tid, 12—18 timer, og da ligeledes forlænger differentieringen, blir farven sort, den giver ogsaa tydelige billeder af centrosomer, akromatisk kjærnespol, bindevævsfibre og mikroorganismer. (Efter Lee og Henneguy).

Benda-(Piersol)'s hæmatoxylin med kobberacetat for cellestudier.

1. Fixering og hærdning i Flemmings vædske (ogsaa i Müllers vædske og i alkohol).
2. Indstøbes, skjæres.
3. Snit (bedst fixeret paa objektglas) beises 8—12 timer i 50° C. (eller 24 timer i ca. 40°, 48 timer i stuetemperatur) i

mættet opløsning af acet. cupric.

4. Udvaskes i vand.
5. Farves i ca. 5 minuter til mørk graa eller sort farve i

vandig hæmatoxylin 1 %.

6. Differentieres i 0.3 % saltsyre til straagul farve.
7. Udvaskes i vand.
8. Fixeres i mættet acet. cupr. opl. til farven atter blir blaa.
9. Udvaskes i vand.

Deshydreres. Indleires i kanadabalsam.

Giver skarp mitosefarvning samtidig med en let protoplasmafarve.

Herxheimers hæmatoxylinfarve for elastiske fibre.

1. Materialet (hud osv.) hærdes helst i Müllers vædske (ogsaa i alkohol). Snit farves 3—5 minuter (op til 30 minuter) i

Hæmatoxylin . . . 1
Alkohol 50 % . . 40
Sol. lith. carb. sat. 1

2. Differentieres hurtigt (5—20 sekunder, ikke for længe!) i officinel jernkloridopløsning.
3. Udvaskes i vand.
4. Indleires i kanadabalsam.

De elastiske fibre næsten sorte, cellerne graaagtige, matte. Passer godt for celloidinsnit.

Dobbeltfarvninger med hæmatoxylin

kan erholdes paa flere maader.

Almindeligst benyttet er eosin (s. 154), pikrinsyre eller syrefuchsin, van Giesons farvning (s. 155).

Hæmatoxylin-eosin.

Denne dobbeltfarvning kan (ligesom karmin-pikrinsyrefarvningen) udføres dels samtidig med, dels efter hæmatoxylinfarvningen.

I. Samtidig med hæmatoxylinen som i:

Renauts hæmatoxylin-eosin.

1. Snit farves 5—10 minuter i:

Mættet vandig (eller alkoholisk) eosinopl. } lige dele.
Glycerin. }
Böhmers hæmatoxylin (se s. 130) saa meget, at den grønne fluorescens saavidt bemærkes.

Kan ogsaa laves saaledes:

Mættet vandig (eller alkoholisk) eosin . 1
Glycerin 1
Böhmers hæmatoxylin 3

2. Udvaskes i 70 % alkohol.
3. Indleires i glycerin (tilsat med lidt farvevædske) eller kanadabalsam (vandextraktion i eosinholdig alkohol). Meget god til oversigtspræparater af hud osv. Overfarver ikke.

II. Efter hæmatoxylinfarvningen kan eosin indføres
1. med vaskealkoholen,
2. med den absolute alkohol til deshydrering; hensigtsmæssigst dog
3. med den ætheriske olje til opklaring (bergamot, origanum). Eosinen tilblandes oljen i opløsning i absolut alkohol (se pikrindobbeltfarvning med karmin s. 128).

Eosin er et meget intenst farvestof, farvningen maa derfor ikke overdrives. Skal mange præparater farves i samme eosinerede olje, maa der fra tid til anden tilsættes ny eosin, da denne udtrækkes af præparaterne.

Pikrinsyre til dobbeltfarvning efter kjærnefarvning med hæmatoxylin anvendes paa samme maade som for eosin beskrevet. Bruges med fordel ved farvede præparater af ossificerende brusk.

Syrefuchsin efter hæmatoxylin farver protoplasma og bindevæv rødt. Bruges især ved farvning af centralnerveorganerne (s. 155).

Pikrinsyre-syrefuchsin ɔ: van Giesons farve hensigtsmæssig ved efterfarvning af bindevæv, glat muskulatur, hyalin-degenererede væv (s. 155).

Orceïn

(indført af Israel 1886 i farvetekniken) er farvestoffet af en lichen, lecanora pårella.

Har egenskaber paa en gang som «basisk» og «sur» farve; farver metakromatisk i sur opløsning (kjærner blaa, protoplasma svagt rødt, celloid- og hornsubstans dybt rødt). Anvendes ligeledes til farvning af actinomycessoppen og elastiske fibre.

Israels orceïnfarvning til kolloidsubstanser.

1. Snit farves til dybrød farve i frisk filtreret

Orceïn	2
Acid. acet. glac.	2
Vand	100

2. Udskylles i vand.
3. Lægges paa objektglas, hvor overskuddet af vand fjernes med filtrerpapir.
4. Paadryppes absolut alkohol nogle sekunder, til kjærnerne viser sig blaa.
5. Alkoholen fjernes ved et kraftigt tryk paa præparatet med filtrerpapir.
6. Cederolje.

Kolloid- og hornsubstans er da dybrød, kjærner blaa, protoplasma lyserødt.

Israels orceïnfarvning til actinomyces

sker paa samme maade, kun at farvestoffet, da det let udskylles i alkohol, maa være meget stærkere, nemlig

mættet opløsning af orceïn i 10 % saltsyre.

Taenzers (Unnas) orceïn til elastiske fibre.

1. Snit lægges i

Orceïn	1
Acid. hydrochlor	1
Absolut alkohol .	100

saavidt at farven dækker, stilles varmt, ikke over 30° C., i aaben skaal i ca. 10—15 minuter (eller koldt i 12—24 timer), til farven er inddampet til en tyk, men flydende masse.

2. Udskylles i 70 % alkohol og nogle sekunder i HCl-alkohol.
3. Lægges i vand, hvor de kan blive, saa længe det ønskes.
4. Absolut alkohol, olje, kanadabalsam.

De elastiske fibre blir mørkebrune paa lys rødlig grund.

Ved celloidinpræparater hefter farven stundom generende stærkt ved celloidinen. I saa fald kan den ifølge Laurent fjernes derfra, idet præparaterne efter affarvningen i HCl-alkohol et øieblik lægges i tyndt ammoniakvand, hvor de blir blaa og afgiver farvestoffet. De bringes da tilbage i HCl-alkohol, og processen fortsættes som ovenfor angivet.

Indigokarmin
(indigo-svovlsurt natron)

er et i vand med blaa farve opløseligt stof med diffus farveevne. Bruges i vandig opløsning fra 0.1—2 % til kontrafarvning ved karmin. Sammen med pikrinsyre giver det en grøn kontrafarve, som hensigtsmæssigt anvendes ved studiet af bendannelse. Angaaende farvens koncentration og farvetidens varighed maa man prøve sig frem (se forøvrigt side 128).

Anilinfarverne (tjærefarverne)

indførtes i den histologiske farveteknik af Waldeyer i 1863, anvendtes først som farvemiddel for bakterier af Weigert og har gjennem denne, Ehrlich og Koch faaet sin største udbredelse i den mikroskopiske teknik.

Anilinfarverne udmærker sig foruden ved, at der indenfor denne gruppe findes en straalende rig veksel af farver,

ogsaa specielt ved den stærkt varierede elektive evne, som de besidder; enkelte giver præcise og pragtfulde kjærnefarver, andre er diffuse protoplasmafarver, og atter andre har specifike farveegenskaber, der tillader, at de benyttes som mikrotomiske reagenser paa forskjellige stoffe eller paa elementer tildels under temmelig komplicerede, om end mindre kjendte, kemiske omsætninger.

Den største anvendelse har anilinfarverne faaet ved farvning af mikroorganismerne. Den herunder hørende mikroskopiske farveteknik er saa godt som udelukkende baseret paa disse farvestoffe, som dermed er bleven et uundværligt hjælpemiddel ved den bakteriologiske undersøgelse.

Ogsaa i den pathologisk-anatomiske mikroskopi forøvrigt spiller de en ikke liden rolle.

I den normale histologi, hvor de gjør tjeneste som særdeles intense kjærnefarvestoffe eller som diffuse farver, indskrænkes i nogen grad deres anvendelighed ved, at de dermed farvede præparater i holdbarhed ikke kan sammenlignes med hæmatoxylin- og karminpræparaterne og lettere afbleges, samt ved at de ikke egner sig til gjennemfarvning af stykker.

Da celloidinen ofte i generende grad og meget haardnakket optager visse anilinfarver, hvorved det hele billede gjøres uklart, er de stundom mindre skikkede ved celloidinpræparater, dog er celloidinindstøbning ikke nogen absolut hindring for deres anvendelse.

En yderligere ulempe ligger endvidere deri, at farvernes kemiske sammensætning ved fabrikmæssig fremstilling endnu er noget vekslende, og virkningen af ensbenævnte farvestoffe derfor ikke altid ens. Ved indkjøb bør man derfor holde sig til kjendte og de samme firmaer.

Anilinfarverne anvendes

a) enten i vandige opløsninger, fra koncentrerede (ɔ: ca. 3—4 %) ned til 1—½ % og endnu tyndere.

b) eller tilsat med andre stoffe, hvilke dels er opløsningsmidler for anilinfarverne, dels fældningsmidler, dels beis.

1. Tilsætning af opløsningsmidler for farvestoffene, f. eks. alkohol, glycerin, oxalsyre, eddikesyre, til farvevædsken bevirker, at farvestoffet mindre let fæster sig i protoplasma og intercellularsubstans i kjærner og bakterier, øger altsaa elektionen. Særlig gjælder dette eddikesyre, der desuden bringer kjærnen til at skrumpe og protoplasmaet til at svulme, hvorved de fysiske betingelser for farveoptagelsen yderligere bedres for kjærnens (bakteriernes) vedkommende og nedsættes for protoplasmaet.

2. Tilsætning af alkali, f. eks. ammoniak (Weigert), bringer de fleste basiske anilinfarver til at udfældes. Ved at afpasse mængden af det tilsatte alkali saaledes at farvestoffet bringes lige paa nippet til at udfældes (Unnas «Schwebefällung»), bemægtiger vævet og — in specie — kjærnen (bakterierne) sig farvestoffet saa meget lettere. Mængden af alkali maa dog ikke være for liden.

3. Tilsætning af meget smaa mængder alkali, eller af salte (boraks) samt af stoffe som anilinolje, phenol, thymol o. lign. øger ogsaa farvekraften, idet disse stoffe virker som beis, hvorved farven lettere fæstes paa vævsdelene, maaske ogsaa fordi de med farvestoffet danner lettere optagelige forbindelser (kfr. Löfflers methylenblaat, Sahlis boraksmethylenblaat, Ehrlichs anilingentianaviolet, Ziehl-Neelsens karbolfuchsin).

Ved mange farvemethoder indbringes beisen dog ikke samtidig med farvningen, men dels før dels efter denne.

Det er specielt for anilinfarvernes vedkommende, at Ehrlich har etableret sin tidligere omtalte inddeling i basiske eller kjærne(bakterie)-farvestoffe, sure eller diffuse (protoplasmatiske) farvestoffe og neutrale, ikke sjelden specifike farvestoffe (se

side 119). Som hovedregel kan denne inddeling være af adskillig interesse, omend den har sine undtagelser.

Af den store masse anilinfarver, som i tidens løb er bleven anbefalet og anvendt, skal her blot omtales de vigtigste, paalideligste og i praksis mest anvendte.

Ligeledes er kun de almindeligste, generelle anvendelsesmaader beskrevne. Til de utallige modifikationer og særanvendelser er kun delvis taget hensyn.

De vigtigste kjærne- og bakteriefarver (basiske) blandt anilinerne er:

Bismarckbrunt (Vesuvin).
Methylgrønt.
Dahlia.
Fuchsin.
Methylviolet.
Gentianaviolet.
Safranin.
Methylenblaat.
Tolnidinblaat.
Thionin.
Nigrosin.

De vigtigste diffust farvende anilinfarver (sure) er:

Pikrinsyre.
Eosin.
Fluorescëin.
Syrefuchsin.

A. De kjærnefarvende (basiske) anilinfarvestoffe.

Bismarckbrunt (Vesuvin).

Bismarckbrunt i 2 % vandig sur opløsning:

1. Snit lægges 2—3 minuter i

Bismarckbrunt	2
opløst under kogning i	
Vand	100

Filtreres ofte, helst ved hver gangs brug; tragt og filter staar i flasken som prop.

2. Udvaskes i vand eller tynd alkohol.
3. Indleiring i glycerin eller kanadabalsam.

Hurtig og nem methode, god kjærne- og bakteriefarvning, egner sig godt til kontrafarvning efter Grams bakteriefarvning, Weigerts nervefarvning, slimfarvning og for præparater, der skal fotograferes. Farver friske (ikke hærdede) kjærner — kfr. methylgrønt.

Methylgrønt.

Methylgrønt i vandig opløsning til kjærnefarvning efter Böttcher-Hermann. Bruges gjerne til kontrafarvning efter fuchsinfarvning af tuberkelbaciller. Fortyndet methylgrønt anvendes til amyloidfarvning; denne farvning beror paa forurensning ved methylviolet.

Mættet vandig opløsning tilsat 1 % eddikesyre eller 0.1—0.5 % osmiumsyre, bedste farvemiddel for kjærner i friskt, uhærdet væv (nukleïnen grøn, protoplasma og bindevæv blaaligt eller violet).

Vævet farves 5—10 minuter, udvaskes i let eddikesyret vand og undersøges ligeledes i saadant, hvori lidt methylgrønt er opløst. Præparaterne er lidet holdbare, kan ikke opbevares.

Ungars Saltsyre-methylgrønt til paavisning af indtørrede spermatozoer.

1/3 % vandig methylgrønt 10 cc.
3—6 draaber saltsyre.

Smaastykker af det til undersøgelse bestemte stof lægges en til flere timer i vædsken, udpilles forsigtig. Bagre del af spermatozoens hoved er da mørkegrønt, forreste del lysegrønt, mellemstykke og hale bleggrønne.

Dahlia, Hoffmanns violet
(til farvning af plasmaceller, Ehrlich).

1. Alkoholhærdede snit lægges 12—24 timer i

Abs. alkoh. 50
Vand 100
Iseddik . . 12.5
Dahlia til mætning.

2. Udvaskes i alkohol, som udtrækker farven af alle vævsbestanddele undtagen plasmacellerne (og stundom mucin).

Fuchsin (magentarødt)
(saltsurt og eddikesurt rosanilin).

Fuchsin i ganske tynd vandig opløsning (blegrød) anvendes til langsom direkte kjærnefarvning af snit, 24 timers indvirkning. Til farvning af gonokokpræparater 10—20 sekunder, afvaskning i vand.

Fuchsin, 1—2 % vandig opløsning, til farvning af forbeningsprocessen (Baumgarten), desuden til farvning af elastiske fibre især i hud, ca. 5 minuters indvirkning med efterfølgende affarvning i 1 % kalilud.

Mættet vandig fuchsinopløsning til dækglaspræparater af bakterier, især koleraspiriller, og til Nissl's gangliecellefarvning.

Anilinfuchsin efter Ehrlich:

Mættet alkoholisk fuchsinopløsning . 10 cc
Anilinvand . . . . . 90 cc

Anilinvand tilberedes ved at ryste 5 cc ren anilin med 100 cc vand og filtrere gjennem dobbelt filter. Maa opbevares mørkt, holder sig ikke længe; bedst frisk tilberedt.

Heller ikke de dermed tilberedte farveblandinger er meget holdbare og bør ikke bruges mere end en maaned gamle.

Anilinfuchsin (og de øvrige Ehrlichske anilinfarveblandinger) kan ogsaa tilberedes ex tempore:

4—5 cc anilinvand hældes i et uhrglas eller saltkar, dertil sættes 6—8 draaber alkoholisk fuchsin-(methylviolet osv.)-opløsning.

Disse Ehrlichske anilinfarvevædsker har en betydelig farvekraft og anvendes især til mikroorganismer. Dog farves ogsaa forhornede celler, fedtkrystaller, kjærnedetritus og plasmakorn.

De bruges især ved Böttcher-Hermanns og Grams methoder.

Karbolfuchsin (Ziehl-Neelsen).

Mættet alkoholisk fuchsinopl. . 10 cc
Karbolvand 5 % . . . . . 90 cc

til farvning af tuberkel- og leprabaciller. Holder sig i vel tilkorket flaske i aarevis.

Weigerts fuchsin-resorcin-jernklorid til farvning af elastiske fibre.

Methoden kan anvendes efter alle slags hærdninger, bedst dog efter alkohol og formol. Ligeledes med eller uden cello idin- eller paraffinindleiring.

Farven tillaves saaledes:

Fuchsin . . 2
Resorcin . . 4
Vand 200

koges op i en porcelænsskaal; tilsættes sol. ferri sesqvichlor (Pharm. Germ. III) 25 cc; koges under omrøren videre 2—5 minuter, afkjøles (behøver ikke at være ganske kold) og filtreres. Vædsken, som løber gjennem filtret, bruges ikke, slaaes bort.

Filtret og det derpaa liggende brunsorte filtrat, henstaar til afdrypning og delvis tørring, lægges i den i mellemtiden atter tørre porcelænsskaal (for at

benytte de herværende rester af farvestoffet) og koges her (forsigtigt!) med 200 cc 94 % alkohol, afkjøles, filtreres, paafyldes 94 % alkohol til 200 cc. Tilslut tilføies 4 cc saltsyre.

Opløsningen holder sig i maanedsvis.

1. Snit lægges i farven 20 minuter—1 time eller endog længere.
2. Afvaskes med alkohol.
3. Opklares i xylol (efter aftørren paa objektglas med filtrerpapir uden abs. alkohol). Bergamotolje ødelægger farven. Kanadabalsam.

De elastiske fibre er blaasorte paa lys grund.

Ved overfarvning kan man differentiere med saltsyrealkohol. Kjærnefarvning kan foretages før eller efter med karmin.

Methylviolet, Gentianaviolet.

(Gentianaviolet er et methylviolet der indeholder enkelte forurensninger. De forskjellige fabrikater har noget forskjellig farveeffekt, almindelig bruges methylviolet 6 B).

Et af de mest benyttede anilinfarvestoffe, anvendes til kjærnefarvning og til flere specifike farvninger.

Methylviolet til kjærnefarvning, i ½—2 % vandig opløsning, efter Böttcher-Hermann.

1. Snit lægges i farven 5—10—20 minuter.
2. Affarves i absolut alkohol, til farveudtrækningen begynder at ophøre.
3. Udvaskes i vand, saa farveextraktionen stanser, eller opklares med en gang i ætherisk olje. Da nellikolje extraherer farvestoffet, kan denne bruges, hvor man paa dette stadium vil extrahere endnu overskydende farve. Nellikoljens virkning stanses ved at føre præparatet over i xylol, cederolje eller bergamotolje.
4. Indleires i kanadabalsam.

Methylviolet til farvning af amyloidsubstans.

1. Snit lægges 5—15 minuter i ½—1 % vandig methylvioletopløsning.
2. Udvaskes i 1 % eddikesyrevand.
3. Indleires i glycerin eller i eddikesur kaliopløsning 50 % (se side 80).

Den amyloide substans viser sig rosenrød til violetrød, det sunde væv mat blaat. De farvede snit maa ikke behandles med alkohol, da denne udtrækker farven; kan derfor ikke indleires i kanadabalsam.

De fineste og nøiagtigste farvninger erholdes ved at lade snittene ligge længere tid, 12—24 timer, i fortyndet farveopløsning før differentieringen med eddikesyre.

Anilinmethylviolet, Ehrlichs farvevædske, tilberedes som for anilinfuchsin opgivet (se s. 145) eller efter følgende formel:

Methylviolet . . 1
Abs. alkoh. . . 15
Anilinolje . . . 3
Vand 80

Anvendes ligeledes til kjærnefarvning og mikrobefarvning efter Böttcher-Hermann, til farvning af tuberkel- og leprabaciller, til Grams bakteriefarvning og Weigerts fibrin- og bakteriefarvning.

Anilinmethylviolet til tuberkelbaciller (og leprabaciller), «Ehrlichs methode».

1. Dækglaspræparater opvarmes til kogning 2—5 minuter (snit hensættes 1 time i thermostat eller 24 timer i værelsetemperatur).
2. Affarves i 20 % salpetersyre (snit ca. 1 minut, dækglaspræparater nogle faa sekunder).
3. Udskylles i 70 % alkohol til farveløshed.
4. Abs. alkohol, æther.olje, kanadabalsam.

Grams bakteriefarvning med iod-anilinmethylviolet.

En af de vigtigste farvemethoder ved mikrobeundersøgelser.

1. Dækglaspræparater eller snitpræparater farves 3 minuter i anilinmethylopløsning (Ehrlichs methylopl.).
2. Lægges ca. 3—5—10 minuter i

Iod	1	Grams iodkaliumopl.
Iodkalium .	2	
Vand	300	

hvorunder præparatet omgives af et tæt violetrødt nedslag.

3. Udvaskes i absolut alkohol indtil alt synligt farvestof er udtrukket.
4. Dækglaspræparaterne tørres i luften, snitpræparaterne i xylol eller bergamotolje, kanadabalsam.

Bakterierne viser sig da dybt sortblaa paa ufarvet grund.

Weigerts fibrin- og bakteriefarvning med iod-anilinmethylviolet.

1. Snit farves 5—10 minuter i anilinmethylviolet.
2. Afvaskes i fysiologisk kogsaltopløsning (½—1 %).
3. Lægges paa objektglas, tørres ved at trykke filtrerpapir fast derover.
4. Overheldes 1—2 minuter med iod-iodkaliumopl. (1—2—100).
5. Overheldes (efter at sidstnævnte er borttrukket med filtrerpapir) med

Anilinolje . 2
Xylol . . . 1

hvorunder den violette farve extraheres af alt andet end fibrintraadene, og forskjellige mikroorganismer, som blir dybt blaafarvede.

6. Indleires i kanadabalsam.

Baade ved Grams og Weigerts methode kan snittene hensigtsmæssigt paa forhaand være vævfarvede med karmin eller bismarckbrunt. Særlig sidstnævnte egner sig godt, hvor præparaterne skal bruges til mikrofotografering.

Weigerts nevrogliafarvning med gentianaviolet.

1. Stykker af hjerne eller rygmarv, ikke over 0.5 cm. tykke, fixeres og beises mindst 8 dage under stuetemperatur, 4—5 dage i legemstemperatur i

Fluorkrom *	2.5
opløst under kogning i	
Vand	100
Eddikesyre	5
Pulveriseret neutralt eddikesurt kobberoxyd	5
Dertil	
Formol	10

Stykkerne lægges først i en flad, overdækket skaal paa filtrerpapir; vædsken byttes efter 1 døgns forløb, senere ikke nødvendigt. Efter 4—5 døgns forløb kan stykkerne overføres i almindelige glas eller krukker i formol og opbevares der i lange tider.

2. Udvaskes i vand.
3. Celloidinindstøbning, skjæring.
4. Snittene lægges først 10 minuter i sol. hypermang. kal. 3 ‰.
5. Reduceres derefter 2—4 timer i en vel filtreret blanding af

Kromogenopl. ** 5 %	45
Myresyre 5 %	45
tilsat før brugen med	
Natriumsulfitopl. 10 %	10

hvori de af den kromsure kali brunede snit affarves.

Ønskes ved den senere farvning bindevævet ufarvet, kan reduktionen her afbrydes; ønskes derimod den kraftigst mulige farvning af nevroglia, uanseet om ogsaa bindevævet faar en let farvetone,

6. Efterreduces snittene 12 timer i en velfiltreret kromogenopl. 5 %.
7. Skylles gjentagne gange i vand.

Snittene kan paa dette stadium om ønskes opbevares flere dage i

Alkohol 80 % . .	90
Oxalsyre 5 % . .	10

---

* Weigert anvender nu fluorkrom i stedet for tidligere kromalun.

** En naftalinforbindelse, der uden selv at være farvende øger fibrenes farveevne.

8. Snittene lægges paa objektglas, aftørres og farves her i faa sekunder i

Varmt mættet alkoholisk (30 %) methylviolet . . 100
Vandig oxalsyreopl. 5

Den videre behandling falder i alt væsentligt sammen med differentiering ved Weigerts fibrinfarvning, altsaa

9. Differentieres et par sekunder i iod-iodkaliumopl. (5 % iodkaliumopl. tilsat med iod til mætning).

10. Udvaskes (grundigt) i

Anilinolje } lige dele,
Xylol }

derefter i ren xylol, for at fjerne alt anilin.

11. Indleires i kolofonium opløst i terpentin, hvori farven holder sig bedst.

Nevroglia viser sig skarpt blaa mod let blaaviolet grund.

Methoden egner sig som nevrogliafarvning kun til menneskeligt centralnervesystem, gir ogsaa gode resultater til at demonstrere galdekapillarer, epitheliale fiberdannelser, miltstruktur, den dobbeltbrydende substans i tværstribede muskelfibre osv.

Processerne 1 og 2, fixering i formol og beisning, kan ogsaa foretages samtidig, idet begge vædsker slaaes sammen.

Safranin,

det klassiske nukleïnfarvestof, findes i handelen i mange forskjellige sorter af meget forskjellig godhed.

Lee & Henneguy anhefaler specielt Grüblers «Safranin O».

Mættet vandig safraninopløsning (Babes) anvendes til kjærnefarvning.

Mættet alkoholisk safraninopl. } lige dele (Flemming).
Vand }

anvendes af Paneth til farvning af slimceller efter Böttcher-Hermanns methode (se s. 121).

Mættet vandig safraninopl. } lige dele (Bales).
» alkohol » }

eller ogsaa

Anilin-safraninopløsning (som Ehrlichs gentianaviolet, se s. 147) er det specielle farvestof til paavisning af kjærnedelingsfigurer; efter Böttcher-Hermanns methode.

Ogsaa anvendelig til paavisning af colloid- og kalkdegeneration; samt til aktinomyceskolber efter Grams methode (se s. 147).

Methylenblaat.

Mættet vandig opløsning anvendes til almindelig kjærnefarvning eller reaktion paa mucin, som antager en mørkeblaa farve. Fremgangsmaade efter Böttcher-Hermann.

Til farvning af slimceller (bægerceller) anvender Hoyer tynde opl. Planeth 1 % opl. efterfulgt af vævsfarvning med vesuvin.

Löfflers alkaliske methylenblaatopløsning

30 cc koncentr. alkohol. methylenblaat
100 cc kalilud $^1/_{10000}$

er meget kraftigt farvende, meget holdbar. Sædvanligst anvendelsesform for methylenblaat. Bruges dels som foregaaende, men fornemmelig til bakteriefarvning (dækglaspræparater) og efterfarvning efter tuberkelbacillefarvning med karbolfuchsin. Kan dog extrahere og substituere denne farve i svagt tingerede præparater (Czaplewski).

Sahlis borax-methylenblaat

Mættet vandig methylenblaatopl. . 24
5 % boraxopl. 60
Vand 24

hensættes en dag, filtreres.

Meget brugbar til farvning af mikroorganismer og centralnervesystemet.

Snit af dette farves 10 minuter til flere timer, afvaskes i vand eller alkohol.

Kühnes karbol-methylenblaat-universalmethode for bakteriefarvning i snit.

1. Snit lægges ca. 30 minuter i karbol-methylenblaat (tilberedt som karbolfuchsin se s. 145).
2. Skylles i vand.
3. Differentieres i saltsyrevand til lyseblaa farve.
4. Neutraliseres i mættet opl. af kulsur lithion (lithionvand).
5. Skylles 2—3 minuter i vand.
6. Deshydreres i abs. alk. (tilsat lidt methylenblaat for at forhindre yderligere farveextraktion).
7. Opklares i anilinolje — methylenblaa derpaa i ren anilin.
8. Xylol, kanadabalsam.

Methoden kan ogsaa anvendes ved fuchsinanilin.

Ehrlichs methylenblaat til vitalfarvning af aksecylindre.

Hertil bruges zinkfri (giftfri) rektificeret methylenblaat opløst i fysiologisk saltvand, $^1/_2$ % klorammonium-

opl., blodserum eller flydende hønseæggehvide. Farvestoffet opløses heri fra 4 % og nedover til 1 ‰; i den senere tid bruger man hellere de svagere opløsninger.

Denne eiendommelige farvemethode har sin hovedinteresse deri, at den kan udføres paa endnu levende eller dog ganske friskt, men ikke paa hærdet eller forandret væv. Den udføres dels ved injektion af farvestoffet i vævet eller i blodstrømmen (ryglymfesækken hos frosk), dels som almindelig ved farvestoffets indvirkning paa det udskaarne væv. Virkningen synes at foregaa bedst, hvor farvevædsken kun i meget tyndt lag dækker gjenstanden.

Farvestoffet ophobes i aksecylinderne. Idet det afgiver surstof til det omgivende væv, gaar det over i en ufarvet levcoforbindelse, som, naar vævet udsættes for luftens surstof, atter oxyderes og paany antager en blaa farve, der viser de fineste nervefibre (aksecylindre) i tildels forbausende rigdom.

Lawdowski finder de bedste resultater med følgende methylenblaat-æggehvide-blanding.

To filtrerede raa æggehvider tilsættes med en lige mængde af

Methylenblaat . . .	0.50
Klorammonium . .	0.50
Vand	100.00

hvori vævet forbliver 3/4—2 timer; fixeres.

Dogiel anbefaler til paavisning af symphatiske nervefibre

1. En galdeblære vaskes i saltvand, lægges 1—1½ time i 37—38° C. paa et uhrglas, overdryppes i tyndt lag med 1/10—1/16 % methylenblaat saltvandopl. Beskyttes mod indtørren ved et dæksel.
2. Fixeres 18—20 timer i mættet vandig pikrinsur ammoniak.
3. Galdeblæren klippes i smaa firkanter, slimhinden afpræpareres og lægges i glycerin + pikrinsur amm. Efter 5—7 dage gjennemsigtig, kan da monteres i glycerin under dækglas.

Farven afbleges meget snart (10—12 min.), hvorfor den maa fixeres ved forskjellige midler, saasom mættet opløsning af pikrinsur ammoniak, Arnstein (fordelagtig tilsat 1 % osmiumsyre), iod-iodkalium, pikrokarmin, eller i Bethes fixationsvædske ɔ:

Molybdænsur ammoniak . 1
Vand 10
Vandstofhyperoxyd 1
Saltsyre (officinel) 1 draabe.

Denne sidste fixationsvædske, der maa anvendes saa kold som muligt, helst paa is, har den fordel, at præparatet senere, efter ½—1 times udvaskning i vand, kan deshydreres i alkohol, klares i xylol og lægges i kanadabalsam. Efter de øvrige fixationsvædsker sker undersøgelsen i glycerin. Fixeringen forandrer den smukke methylenblaa farve til en skidden rødligbrun.

Unnas plasma- og mastcellefarvning med methylenblaat

Methylenblaat . 1
Kulsur kali . . 1
Vand 100

fortyndes ved hver gangs brug til det 10—20 dobbelte med anilinvand.

1. Heri farves snit i 12—24 timer,
2. afvaskes i 70 % alk.,
3. deshydreres,
4. xylol, kanadabalsam.

Plasmacellerne blir blaa, mastcellerne røde.

Nissl's methylenblaatfarvning af centralnervesystemets celler.

1. Smaa stykker hjerne eller rygmarv, hærdede i alkohol og direkte heftede paa træ eller kork med gummi (side 96), skjæres og farves under opvarmning til blæredannelse i

Methylenblaat, B, pat. . 1.50
Venetiansk sæbe 0.70
Destill. vand 400.00

2. Differentieres i

Vandklar anilinolje . . 10
Alkohol 96 % 90

(anilinoljen maa holdes godt beskyttet mod lyset).

Naar ingen farveskyer mer afgives,

3. lægges snittene paa objektglas, tørres med filtrerpapir og
4. overdryppes med benzin,
5. indleires i seig benzinkolophonium tilsat med benzin i overskud 24—30 timer, saa der øverst afsættes en klar, gjennemskinnende masse.

Objektglasset med præparatet opvarmes forsigtigt over flammen, til al benzin er fordampet.

Methoden anvendes til studium af pathologiske forandringer i ganglie-cellerne.

Toluidinblaat.

Vandig opløsning 1—2 % (renblaa, mættet opl. er violetrød, alkoholiske opløsninger atter blaa) særdeles godt reagens paa mucin, normalt og pathologisk (Hoyer).

1. Snit, forfarvet i karmin eller kochenille, farves 5—10 minuter.
2. Udvaskes i stærk alkohol, 90 %.
3. Abs. alk. (benzinalkohol).
4. Opklares i ætherisk olje.

Hvis der, selv efter passagen i abs. alk., ikke skulde være indtraadt fuldkommen differentiering i præparatet, opklares i nellikolje, der opløser en hel del af farven; man maa erindre, at ogsaa celloidin opløses af nellikolje.

Slim og colloid blir ved denne farvning fremtrædende rødviolet, celle-kjærner blaa, celloidinen grøn.

Thionin

anvendes til mucinfarvning paa samme maade som for toluidinblaat beskrevet.

Kantorowicz anvender thionin til farvning af amyloid substans i balsampræparater:

1. Snit farves 3—5 minuter i mættet vandig thioninopl.
2. Deshydreres i Weigerts anilinolje-xylol (se s. 147).
3. Indleires i kanadabalsam.

Amyloid substans blir lysblaa, mucin rød, det øvrige væv blaat til violet.

Nigrosin.

Vandig opløsning 0,5 % til farvning af Müller-hærdede ganglieceller og nervefibre (aksecylindre) udmærket god til rygmarvsnit.

1. Farves 5—10 minuter.
2. Affarves i alkohol eller saltsyrealkohol. Kan kontrafarves i eosin eller pikrinsyre.

B. Diffust farvende (sure) anilinfarvestoffe.

Pikrinsyre.

Gule krystaller let opløselige i vand, specielt i alkohol. (Pikrinsyrens anvendelse til macerering, fixering eller til dekalcinering se side 77, 86 og 94). Farver diffust, uden synderlig udvælgelse, dog kraftigst fibrilært bindevæv, forhornet epithel samt muskelceller.

Bruges væsentlig til dobbeltfarvninger efter kjærnefarvning med karmin (se side 128) eller hæmatoxylin (se side 139); i van Giesons farveblanding o. fl. Indbringes i præparatet paa alle farvningens stadier.

Virker meget intens, bør ikke bruges i mere end $^1/_2$% opl., overfarvning kan let finde sted, og selve den foregaaende kjærnefarvning kan da afbleges ved pikrinens syrevirkning.

Eosin.

To hovedformer:

1. opløselig i vand og 2. opløselig i alkohol.

Opløsningerne er i gjennemfaldende lys violetrødlige, fluoridicerer grønligt i paafaldende lys. Farven ikke dyb, men meget intens, overfarver let, bør ikke anvendes i for stærke opløsninger, uden hvor der ønskes substitutionsfarvning (se side 121).

Diffust farvestof, dog med særlig affinitet til epithel og bindevæv; røde blodlegemer faar en eiendommelig murstensfarve, specifik reagens paa de «eosino(s. acido)phile» granulationer i visse rundceller (benmarvslococyter).

Bruges mest som kontrafarve ved hæmatoxylinkjærnefarvning (se side 138). Kan indbringes i præparatet i alle farvningens stadier ligesom ved pikrinsyre. Bruges meget i anilindobbeltfarvninger (se nedenfor).

Et eosinerne meget nærstaaende stof, fluoresceïn, knyttes efter Czaplewski og Amann sammen med methylenblaat til affarvning og substitutionsmiddel efter tuberkelbacillefarvning med fuchsin (se tuberkelbacillefarvning).

Amanns fluoresceïn-methylenblaat til tuberkelbacille- og omfarvning.

Fluoresceïn	15
Krystallinsk methylenblaat .	15
Abs. alk.	500

Syrefuchsin (fuchsin S).

Udpræget farvestof for fibrilært bindevæv og protoplasma. Bruges mest i kombinerede farver.

Altmanns granulafarvning med syrefuchsin.

1. De yderst tynde snit (1—2 μ) farves paa objektglas under opvarmning, til glasset neppe kan berøres, i

Syrefuchsin	20
Mættet filtr. anilinvand .	100

2. Afkjøles.
3. Differentieres ved afskyllen med

Mættet alk.-pikrinsyre .	1
Vand.	2

og opvarmes 30—60 sekunder i paraffin i samme vædske.

4. Alkohol, xylol, kanadabalsam.

Kombinerede anilinfarver.

van Giesons syrefuchsin-pikrinsyre-blanding til farvning af bindevæv, muskelceller, hyalin- eller slimdegeneration.

1. Snit kjærnefarves kraftigt i et hæmatoxylinfarvestof, udvaskes godt.
2. Kontrafarves ½—1 minut, sjelden 2—4 minuter i van Giesons blanding

Varmt mættet vandig pikrinsyreopl .	150
Koldt » » syrefuchsin . . .	3

3. Afvaskes ½ minut i vand (om fornødiges tilsat med lidt af farven for at undgaa for stort farvetab i vædsken).

4. Deshydreres, opklares i xylol, eller ol. orig. — ikke i bergamotolje —, kanadabalsam.

Bindevæv viser sig rubinrødt, glatte muskelceller brune, slim (efter sublimatfarvning) blaat, hyalint degenereret væv skinnende rødt.

Pikrin-indigokarmin

Mættet vandig pikrinsyreopl. . .	2
» » indigokarmin . .	1
Vand	10

til kontrafarvning af karmintingerede snit specielt af ossifikationspræparater. Cellekjærner røde, nydannet ben grønt, bindevæv og blod gult.

Ehrlichs trefarveblanding (triacid-opløsning 1886) til farvning af neutrofile levkocytgranulationer (ε-granulationer) i blodet

Mættet vandig orangeopl.	125 cc
» » syrefuchsin tilsat med 20 % alkohol	125 cc
blandes, hertil sættes Abs. alk.	75 cc
under omrøren tilsættes efterhaanden Mættet vandig methylgrønt	125 cc

Opløsningen maa staa længere tid før brugen. Maa ikke filtreres, men det nødvendige kvantum optages fra midt i vædskeoverfladen med en pipette.

Benævnelsen «triacidopløsning» er forsaavidt ukorrekt, som den ene af farverne, methylgrønt, er basisk.

Farven er, som ogsaa de følgende, vanskelig at faa godt tillavet. Den bør helst bestilles færdig fra Grübler (Leipzig).

Farvningen foregaar saaledes:

1. Blod udbredes i tyndest muligt lag paa dækglas og lufttørres der.
2. Opvarmes flere timer til 120 ° C.
3. Farves nogle minuter.
4. Skylles i vand.
5. Lufttørres, indleires i kanadabalsam.

Hæmaglobin er orangegult, kjærnerne grønlige, neutrofile korn violette.

(Ehrlich)-Biondi-Heidenhains triacidopløsning (1888) er saaledes sammensat:

Mættet vandig filtreret orangeopløsning .	100 cc
» » » syrefuchsin » .	20 cc
» » » methylgrønt » .	50 cc

bruges som forrige eller til snit:

1. Fixeres i sublimat.
2. Snit varmes 6—24 timer i ovenstaaende vædske fortyndet 60—100 gange.
3. Udvaskes i abs. alk.
4. Xylol, kanadabalsam.

Farvningen af snit blir efter Heidenhain varigere, om dette før farvningen lægges 15 minuter i 1 ‰ eddikesyre, beises i iodtinktur og udvaskes i abs. alk.

Ehrlichs nye triacidopløsning (1892) farver hurtigere.

Orange G, mættet vandig opl.	120
Syrefuchsin » » »	80
Methylgrønt » » »	100
Vand	300
Abs. alk.	180
Glycerin	50

anvendes som den oprindelige (se forrige side).

Trefarveblanding til eosinofile levkocytgranulationer (v. Kahlden).

Orange	ana 2
Indulin	
Eosin	
Glycerin	30

Dækglaspræparat som ovenfor beskrevet.

Lists eosin-methylgrønt for slimkjærtler og bruskvæv.

1. Snit lægges 5—15 minuter i

   ½ % vandig eosinopl. . 5 cc
   Abs. alk. . . . . 15 cc

2. Udvaskes i vand.
3. Kontrafarves 2—5 minuter i

   ½ % vandig methylgrønt.

4. Udvaskes i vand.
5. Affarves i abs. alk. til den røde eosinfarve atter begynder at skinne igjennem.
6. Ætherisk olje, kanadabalsam.

I kjærtler blir cellesubstansen rosa, kjærner og cellenæt blaagrønne, i brusk blir celler og perichondrium rosa, grundsubstansen blaagrøn.

Metalimpregnationer.

De til histologiske farvninger anvendte metaller er væsentlig sølv, kviksølv, guld og osmium. Naar undtages osmium, er de alle usikre og lunefulde, maaske fordi deres virkesæt endnu er ukjendt; men naar de lykkes, gir de særdeles fine og smukke billeder.

Sandsynligvis beror metalfarvningerne paa, at de anvendte metalsalte og oxyder reduceres i forbindelse med vævet, tildels ved lysets indvirkning.

Medens farvningerne med de organiske farvestoffe (tinktionerne) som regel kræver kemisk forandret ɔ: fixeret og hærdet væv, finder ved metalfarvningerne (impregnationerne) det modsatte forhold sted, idet vævet her helst maa være ganske friskt, og impregnationerne som regel ikke lykkes ved kemisk forandrede væv.

Ved arbeidet med metalopløsninger maa metalinstrumenter undgaaes, da vædskerne dekomponeres ved berørelse hermed. Man benytter naale af glas, elfenben, træ, pindsvinenaale osv.

Sølv.

Sølv indførtes i den histologiske teknik af His (1856) og Recklinghausen (1860). Anvendes næsten udelukkende i form af sølvnitrat, enten i substans eller i opløsninger 1—$^1/_2$—$^1/_{10}$ %.

Udkræver, hvor det anvendes som første eller eneste farvemiddel, ganske friskt (saa godt som levende), uforandret, ikke indtørret væv.

I regelen er den ved sølvnitrat fremkaldte farvning negativ ɔ: cellerne farves ikke, men kun kitt- og mellemsubstans samt vævsspalterne.

I disse diffunderer sølvopløsningen først ind og forener sig med de derværende opløselige albuminater til uopløselige sølvalbuminater, medens sølvet ved kortvarig indvirkning ikke trænger ind i celleprotoplasmaet. Idet præparatet derpaa udsættes for indvirkning af direkte sollys eller dog meget intenst diffust lys, reduceres disse sølvforbindelser, og man faar cellegrænserne skarpt tegnede i mørkebrunt til sort, medens cellerne selv forbliver ufarvede. Kjærnefarvning kan senere foretages paa en af de almindelig brugelige maader især med hæmatoxylin (Böhmer, Delafield, Ehrlich).

Anvendes derimod meget tynde sølvnitratopløsninger, og lader man disse indvirke i længere tid, blir ogsaa cellerne imbiberede dermed, og man faar ved den paafølgende reduktion positive billeder, idet særlig kjærnen men ogsaa protoplasmaet antager brun farve. Denne positive sølvfarvning har dog liden betydning.

Lysforholdene er ved alle sølvimpregnationer af stor betydning. Den fysikalske indtrængen af sølvopløsningen bør ske i dæmpet lys; reduktionen derimod om muligt i direkte sollys for at blive rigtig vellykket. Sølvfarvninger bør derfor forbeholdes sommertiden og godveirsdage.

Er lyset for svagt, sker der enten slet ingen reduktion, eller denne blir ufuldstændig, og man faar senere en eftersværtning, der kan blive diffus og gjøre præparatet ubrugeligt.

Man kan dog opbevare sølvimpregnerede og vel udvaskede objekter hærdede i alkohol flere dage i absolut mørke og faa smukke præparater, naar reduktionen senere foretages i sollys.

En god sølvfarvning kræver saaledes:

Friskt væv.

Iagttagelse af rigtig styrke og indvirkningstid af sølvopløsningen.

God udvaskning.

Direkte sollys til reduktion.

Sølvnitrat i substans (His, Ranvier) til farvning af cornea og fibrøst væv.

1. Den fastsiddende cornea paa et friskt udtaget øie stryges med lapisstift.
2. Cornea udtages, lægges i destilleret vand, epithelet viskes af med en pensel.
3. Udsættes for lyset til let brun farve.

Sølvnitrat i opløsning $^1/_2$—$^1/_5$ % til farvning af epithel (endothel) paa membraner, lungeepithel, Ranviers snøreringe (kors) i nerver samt intercellularsubstans og vævspalter. Ingen metalinstrumenter! Sort flaske!

1. Den friske membran (oment) udspændes som et trommeskind over en glasskaal eller paa en korkring ved hjælp af pindsvinenaale, berberisnaale o. l., eller ved de Hoggans-Eternodske ringe.
2. Membranen bør under hele behandlingen holdes udspændt, da der i de ved foldning dannede furer let kommer forstyrrende metalnedslag. Spyles lempelig med destill. vand eller 1 % salpeteropl. for at fjerne alle blodrester og albuminspor.
3. Overrisles med eller lægges fra et par sekunder til 10 minuter i $^1/_2$—$^1/_5$ % nitr. argent. opl.

   Større vævstykker maa gjennemtrænges længere tid i fuldstændigt mørke.

   Naar objektet har faaet et jevnt melket overtræk,
4. udskylles det i destill. vand og udsættes først heri for direkte sollys, indtil det har en mørk rødbrun farve (5—10 minuter),
5. udskylles i fortyndet kogsaltopløsning ($^1/_5$ %), hvorved frit og endnu ureduceret sølvnitrat udfældes, saa eftersværtning undgaaes, eller efter Legros et par sekunder i 2 % natrium hyposulfit.

   Undersøges i glycerin eller
6. hærdes i mørke i alkohol, deshydreres, opklares, indleires i kanadabalsam.

I stedet for ren opl. af sølvnitrat anbefaler Boveri

$$\left.\begin{array}{l}\text{Sol. nitr. arg. . 1 \%}\\ \text{Acid. osm. . . 1 \%}\end{array}\right\}\text{ lige dele,}$$

hvorved der samtidig opnaaes god fixering af vævet samt sværtning af fedt og myelin. Derfor meget anvendelig for nerver.

Hoyer anvender i stedet for sølvnitrat sølv-ammoniumnitrat, der kun farver intercellularsubstans og ikke giver positive billeder. Det tilberedes saaledes:

En opl. af nitr. argent. tilsættes med ammoniakopl., indtil det dannede bundfald netop opløses igjen; fortyndes med vand, til opløsningen indeholder 0.75—0.5 % sølvnitrat.

Golgis kromsølvfarvning.

Denne behandlingsmethode blev først benyttet til undersøgelser af centralnervesystemet, over hvis finere anatomi i mange henseender er kastet nyt lys. Senere har methoden ogsaa fundet frugtbar anvendelse ved undersøgelser over de perifere nerver, musklerne, kjertelorganerne (udførselsgange og sekretkapillarer), benlegemer, elastiske fibre osv.

Den beror ikke, som de egentlige «sølvfarvninger», paa en i vævet stedfindende reduktion af sølvsaltet, men paa en udfældning af fint fordelt kromsølv inde i vævet.

I sine hovedtræk udføres methoden saaledes, at objektet først gjennemtrænges af en 3—5 % opl. af dobbelt kromsur kali, hvortil medgaar dage og uger; derefter overflyttes det i en 0,75—1 % opl. af salpetersurt sølv, hvoraf det dernæst imbiberes. Hvor disse to saltopløsninger træffes, dannes et mørkt sortbrunt nedslag af kromsølv, som skarpt tegner vedkommende formelementer.

Det tør være meget tvivlsomt, om der foregaar nogen kemisk forbindelse mellem vævsdelene og det udfældte kromsølv. Antagelig afleires dette i fine saftkanaler eller sprækker i og omkring cellerne, og ved kjertelorganer i sekretkanalerne og danner en slags afstøbning af disse hulrum. Da dannelsen af kromsølvet er afhængig af, hvorvidt imbibitionsforholdene i vævet tillader de to opløsninger at mødes, er resultaterne af denne behandling for saa vidt usikre og ujevne. Udeblivelse af reaktionen betyder saaledes ikke, at vedkommende celleform eller vævselement mangler, kun at vædskerne ikke begge har trængt ind i vævet. Methoden er saaledes ikke egnet for pathologiske objekter. Desuden optræder ofte nedslag, der ikke staar i nogen forbindelse med vævets bygning eller dog ikke med sikkerhed kan tilskrives noget bestemt enkelt formelement. Methodens resultater maa derfor i de enkelte tilfælde anvendes med kritik.

Den omtalte ujevnhed i resultatet har imidlertid paa den anden side været medvirkende til methodens store udbredelse. Thi netop derved, at kun enkelte partier, enkelte celler paa denne maade farves, viser disse sig med ganske særegen tydelighed og skarphed.

Fra mange hold er methoden bleven modificeret, dels for at gjøre præparaterne varigere, idet Golgi-farvningen har vist sig lidet holdbar, særlig naar præparaterne kommer under dækglas — dels for at gjøre den hurtigere og paalideligere eller for at undgaa de forstyrrende nedslag uden forbindelse med vævselementerne.

Da reaktionsvædskerne trænger langsomt ind i vævene, maa disse skjæres i smaa stykker (ikke over $^1/_2$ cm. paa nogen kant). For centralnervesystemets vedkommende er dette vanskeligt paa grund af den bløde konsistens. Af hjerne og rygmarv lægges derfor lidt større stykker i den første hærdningsvædske (dobbelt kromsur kali), hvor de efter 1—2 timers forløb har faaet en saa vidt fast konsistens, at de uden skade kan opkløves i de for reaktionen nødvendige smaa stykker.

Stykkernes fixering og kromkaliens indtrængen i vædsken paaskyndes ikke lidet ved tilsætning med osmiumsyre eller formol, samt ved at lade indvirkningen foregaa i noget høiere temperatur (25—29° C.).

Sølvopløsningen virker hurtigere, naar den tilsættes en liden mængde eddike- eller myresyre (1 draabe til 100 cc).

Ved overførelse fra kromkali- til sølvopløsningen dannes straks et meget rigeligt bundfald paa stykkernes overflade. Dette bundfald, som gjør sølvopløsningen tyndere og de mikroskopiske billeder utydeligere, kan undgaaes dels derved, at de fra kromkaliopløsningen kommende stykker aftørres paa filtrerpapir, dels ved at afvaske dem i tynd (brugt) sølvopløsning (Petrone), ved at besmøre de friske stykker med blod (Ramon y Cajal), eller ved at omgive stykkerne før behandlingen med en grød af filtrerpapir udrevet i vand (Martinotti), bedst vistnok

ved at støbe dem paa kork med en gelatinmasse (Sehrwald), hvorved diffusionen sker meget jevnt. Naar præparaterne atter tages op af sølvopløsningen, fjernes gelatinen ved en varm, mættet opl. af dobbelt kromsur kali.

Hvis farvningen ikke er lykkedes, hvilket man bør overbevise sig om ved at gjøre barberknivsnit, idet stykkerne tages op af sølvbadet, kan processen gjentages. Man lægger atter stykket i kromkaliopl., dernæst i sølv — «dobbelt impregnering» —, ja processen kan endog flere gange saaledes repeteres.

Vand og vandige opløsninger (fortyndet alkohol) opløser en del af det dannede kromsølv og gjør præparaterne mindre skarpe. Derfor bør saadanne vædsker undgaaes eller benyttes saa lidet og i saa kort tid som muligt.

I det hele taaler Golgi-præparater daarligt fugtighed. Dette ansees ogsaa for grunden til, at de for at holde sig maa opbevares frit uden dækglas, idet den selv efter deshydrering i præparatet indeholdte fugtighed antages at være grunden til, at Golgi-præparater snart ødelægges under dækglas. Dog kan dækglas anvendes, naar præparaterne efter indleiring i kanadabalsam ophedes til 50—60° C. 30 minuter, før dækglasset lægges paa (Fick). Man bør da anvende fast, ved ophedning smeltet kanadabalsam, ikke balsam opløst i terpentin eller xylol (Ramon y Cajal).

Det har sine ulemper med disse ubedækkede præparater, selv om kanadabalsamen stivner til glashaardhed. De blir let støvede, og balsamlaget er ofte for tykt og har for ujevn overflade, til at stærkere linsesystemer kan benyttes. Man kan til en vis grad afhjælpe dette ved at montere præparaterne i kanadabalsam paa dækglas, som derpaa lægges med præparatet nedad paa et gjennembrudt objektglas, en tynd træplade forsynet med en aabning, eller ogsaa frit svævende paa to med kanadabalsam til objektglasset fæstede glaslister. Man faar da som ved de sædvanlige mikroskopiske præparater en glat dækglasflade opad mod linsesystemet.

Man har søgt at give Golgi-præparaterne en større holdbarhed ved forskjellige fixeringsmidler, der virker ved at reducere det opløselige kromsalt til mere uopløselige forbindelser (metallisk sølv). Fordelagtigst er den af fotograferne brugte hydrochinon-natriumsulfid-fixering.

Nedenfor angives et par af de hidtil anvendte fremgangsmaader ved Golgis farvning:

Golgis oprindelige, langsomme methode.

1. Absolut friske (endnu varme) ganske smaa, ikke over 0,5 cm. tykke stykker af centralnervesystemet lægges i rigelig (40—50 volum) 2 % opl. af dobbelt kromsur kali, hvor de om sommeren forbliver 14 dage, om vinteren 4 uger.
2. Afvaskes i vand.
3. Overføres i

   0.75 % opl. af salpetersurt sølv, hvor de om sommeren forbliver 2—3 dage, om vinteren 8—10 dage.
4. Deshydreres i abs. alkohol.
5. Opklares i terpentin, hvor præparaterne ogsaa pilles i smaastykker.
6. Indleires i dammar harpix.
7. Henlægges i lyset til sekundær impregnation, i solen 8—10 dage, i diffust lys 3—6 uger.

Golgis hurtige methode (med osmiumsyre).

1. Absolut friske stykker lægges i

   2 % opl. af dobbelt kromsur kali . 10 dele
   1 % opl. af osmiumsyre . . . . . 2 »

   Efter 1 times forløb kan stykkerne skjæres i smaa firkanter. Præparatet forbliver i opløsningen i 4—24 timer.
2. Overføres i

   0.50 % salpetersur sølvopløsning i 2—3 dage. Det kan blive her i meget lang tid.
3. Deshydreres i abs. alkohol.
4. Terpentin.
5. Kanadabalsam (Dammar).

Efter de forskjellige formaal man har med sin undersøgelse, kan man indrette sig paa lidt forskjellig maade efter nedenstaaende skema:

1 a. Friske vævsdele, helst af unge dyr eller foetus, lægges i

Sol. bikrom. kal. 3.5 % . 4
Acid. osmic 1

hvor de forbliver 2—7 dage ved en temperatur af 25—26° C. Fra 25—50 cc vædske for hver cc af vævet.

Efter opholdets varighed vil man faa forskjellige vævsdele mest impregnerede. Til nevroglia- og sekretkapillærer fordres 2—3 dage, til nerveceller 3—5 dage, til nervefibre og collateraler 5—7 dage. (Lenhossék).

1 b. Istedetfor osmiumsyreblandingen kan ogsaa benyttes følgende formol-blanding (Kopsch)

Sol. bikrom. kal. 3.5 % . 4
Formol 1

der blandes straks før brugen; denne blanding giver gode resultater paa 24—48 timer gammelt materiale, f. eks. efter sektioner hos mennesker.

Efter 24 timers ophold i denne blanding lægges stykkerne i ren 8,5 pct. bikrom. kaliopl.

Man kan ogsaa først fixere i ren formol og dernæst impregnere med opl. af dobbelt kromsur kaliopl.

I 1 a eller 1 b forbliver vævstykkerne 2—7 dage.

2. Afvaskes hurtigt i vand, aftørres med filtrerpapir og omgives om fornødiges med papirgrød eller støbes i 10 % gelatin paa kork (for at undgaa for stærke udfældninger).

3. Lægges i 0.75 % salpetersur sølvopløsning, hvortil er sat 1 draabe myresyre for hvert 100 cc vædske. Maa ikke holdes varm. Forbliver i vædsken 2—6 dage, kan dog ligge længer.

4. Skjæres indesluttede i hyldemarv eller indstøbt i celloidin, (hurtig behandling, for at præparatet ikke skal udludes for meget).

Tykke snit, 50—80 μ.

Snittene undersøges med svag forstørrelse.

Er kromsølvudfældningen utilfredsstillende, lægges hele stykket tilbage i bikrom. kali-opl. et par dage, dernæst i sølvopløsning (dobbelt impregnation) og undersøges da paany.

Snittene kan her fixeres, og Stöhr anbefaler følgende fremgangsmaade:

1. «Femdobbelt hydrochinonfremkalder» * fortyndes til 12 gange saa stort volum, deraf . . . . . 20 cc
   Abs. alk. . . . . 10 cc
   Heri ligger snittene 5 minuter, til de blir mørkegraa eller sorte.
2. 70 % alk., 10—15 min.
3. Opl. af undersvovlsurt natron 20 %, 5 min.
4. Udvaskes i vand 24—36 timer. Fixerede præparater kan dobbeltfarves med de vanlige histologiske farver. Taaler dækglas.

5. De brugbare snit deshydreres i abs. alk., opklares i bergamotolje, xylol, kanadabalsam. Ophedes, til balsamen størkner.

Monteres direkte paa objektglas eller paa dækglas med gjennembrudt objektglas osv. (se s. 163).

En særegen modifikation af Golgis kromsølvmethode er:

Martinottis sølvfarvning af elastiske fibre.

1. Friskt væv i stykker paa 2—3 cc lægges 24 timer i 2 % arsensyre. Hvis stykket indeholder periost og muskelinsertioner med ben, bruges 4 % arsensyre i 50° C., hvorved benet samtidig decalcineres.
2. 5—15 minuter i Müllers vædske.

---

* «Femdobbelt hydrochinonfremkalder» er saaledes sammensat: 5 gr. hydrochinon, 40 gr. natr. sulphurosum, 75 gr. carbonat kalici, 250 cc vand.

3. 24—48 timer i

Nitr. arg. . . .	2,00
Vand	3,00
Glycerin	15,00

4. Udvaskes hurtigt i vand.
5. Ligesaa i flere skifter alkohol, hvori det tilslut opbevares og skjæres.
6. Udvaskes i 0.75 % saltvand.
7. Lægges i balsam, beskyttet mod lyset.

Istedetfor sølvsalte har Golgi og flere ogsaa anvendt kviksølv (sublimat) med fordel.

Kviksølv.

Golgis-Mondinos kviksølvimpregnation af nerveceller.

1. Hærdning i Müllers vædske eller i 2 % bikrom. kali, helst smaa stykker, rigelig vædske, som oftere maa byttes. Hærdningen tager 2—4 uger eller mere. (Skal en hel hjerne hærdes, injiceres den desuden med samme vædske).
2. Efter endt hærdning overføres direkte i 0.5 % sublimat, som i begyndelsen veksles hyppigt, senere sjeldnere, naar den ikke mere blir gul.

   I sublimaten forbliver stykket mindst 8—14 dage, gjerne flere maaneder til et aar (jo længere jo bedre).
3. Skjæres (snittene skylles i en opl. af Na_2S, hvorved de blir sortere), afvaskes, lægges i damar.

Cox's kromkviksølvimpregnation for centralnervesystemet.

Vævstykkerne lægges i følgende hærdningsvædske:

Sol. bichromat. kali 5 %	20	dele
Sol. chloret. hydrarg. corros 5 %	20	»
Sol. chromat. kalici (stærk alkal.)	16	»
Aquæ dest.	30—40	»

hvor de forbliver længere tid, vintertemperatur 2—3 maaneder, sommertemperatur mindst 1 maaned.

Skjæres da med en gang, deshydreres, monteres i kanadabalsam uden dækglas.

Guld.

Indført af Cohnheim 1866, bruges det ædle metal især til farvning af nervernes aksecylindre, til hvilke guldet synes at have en speciel affinitet. Dog farves ogsaa tværstribede muskelfibre og bindevævsceller især kornealceller bedre i guld end i noget andet farvestof. Det anvendes som guldklorid eller hyppigere guldkalium(natrium)klorid, idet opl. af dobbeltsaltet viser sig at være stabilere end det enkle klorguld. Man er overalt enig i at beundre finheden og elegansen ved en vellykket guldfarvning og i at beklage methodens usikkerhed.

Denne usikkerhed kommer vistnok af vort mangelfulde kjendskab til guldfarvningens kemiske og fysiske betingelser.

Som regel fordres til guldfarvning friskt væv; dog gjennemtrænges dette ved saa godt som alle methoder først med en (sædvanligvis organisk) syre, før det udsættes for guldkloridets indvirkning. Syren anvendes for at lette guldkloridets indtrængen i vævet, hvilket ellers kun vanskeligt foregaar, da guldkloridet, som de fleste metalklorider, er et fixerings- og hærdningsmiddel, der vanskeliggjør diffusionen. Efter den gjængse, men maaske mindre rigtige opfatning tjener syren ogsaa til at lette reduktionen af guldklorid i vævet. Drasch antager, at den ved syren bevirkede vævsforandring er en væsentlig del af methoden. Efter hans opfatning lader ganske uforandrede vævsnerver sig ikke guldfarve, der maa en bestemt grad af mortifikation til. Han anvender derfor ikke friskt, men 12—24 timer gammelt materiale; nerverne gjennemgaar da en naturlig dekomposition, der ogsaa er ledsaget af syredannelse i vævet, og opnaar derved paa en lempelig maade den for guldfarvningen heldigste tilstand.

Guldkloridopløsninger bør opbevares paa mørke flasker og i mørkt skab.

Löwits guldkloridfarvning med myresyre, for aksecylindre og kornealceller.

1. Friskt væv lægges i 50 % myresyre (1/2—5 minuter), til det er gjennemskinnende.
2. Overføres i 1 % guldkloridopløsning (guldkaliumklorid), hvor det forbliver i mørke 10—15 minuter, til det er helt igjennem gulfarvet.

   (Ved siden af den aabne skaal med guldkloridopl. anbefaler Cziky at sætte lidt 1 % osmiumsyre ligeledes i aaben skaal og hvælve en æske over begge; osmiumdampen udøver da en let fixering og paaskynder indvirkningen.)
3. 33 % myresyre i mørke, 24 timer
4. Ren myresyre i mørke, 24 timer.
5. Udvaskes i destill. vand.

Vellykkede præparater er paa overfladen gulgraa, inde i massen dyb violette. Kan undersøges som pillepræparater eller i snit; indleires i glycerin eller i kanadabalsam.

Ranviers guldkloridfarvning med citronsaft (især anvendelig for kornea).

1. Friskt udtaget væv lægges 5—10 minuter i saften af en nys udpresset citron, der er filtreret gjennem flanel. Det blir der gjennemskinnende.
2. Udvaskes hurtigt i destill. vand.
3. Ca. 20 minuter i en 1 % guldkloridopløsning.
4. Udvaskes atter hurtigt i destill. vand.
5. Reduktionen foregaar i lyset i 24—48 timer i let eddikesyret vand (2—3 draaber $\overline{A}$ paa 50 cc vand).

Naar methoden anvendes til motoriske nerveender i tværstribede muskler, udføres reaktionen i mørke i ca. 12 timer ved 25 % myresyre.

Ranviers guldkloridfarvning med myresyre.

1. 1 % guldkloridopl. . 4
   Myresyre (ren) . . . 1
   koges, afkjøles.

   Heri lægges det friske væv ca. 20 minuter.
2. Udvaskes hurtigt i destill. vand.
3. Reduceres i lyset i 20 % myresyre.

Ved den samtidige indvirkning af myresyre og guldklorid opnaaes, at myresyrens svellende indvirkning paa vævet (nerveenderne) modvirkes af guldkloridet. Ved kogningen overføres guldsaltet desuden i en lettere reducerbar tilstand. Processen er meget sikker og ømfindtlig.

Drasch's guldkloridfarvning uden syrer.

1. Vævet anvendes ikke friskt, men først fra 12—24 timer efter døden (opbevares paa et kjøligt sted, 4—5° C., iskasse).

   Smaa udskaarne vævstykker lægges 1 time (mørkt) i 0,5 % guldkloridopløsning, under gjentagen omrøring af vædsken.
2. Udskylles (mørkt) 8—16 timer i destilleret vand.
3. Reduktionen afsluttes i 15 % myresyre i lyset.

Frisch's guldkloridfarvning for alkoholpræparater.

1. Snittene udvaskes i vand.
2. Lægges 24 timer i 6 % klornatriumopl.
3. Derpaa 10 min. i 10 % myresyre.
4. Udvaskes godt.
5. Lægges (mørkt) ½—3 timer i 1 % guldkloridopl.
6. Udvaskes i vand.
7. 24 timer i 10 % myresyre.

Freuds guldkloridfarvning for objekter hærdede i Müllers vædske.

Farver kun aksecylindre.

1. Snit farves 3—5 timer i 1 % guldkloridopl.
2. Afvaskes i vand.
3. Lægges 2—3 min. i

   Ætsnatron 1
   Destilleret vand 6
4. Afvaskes i vand.
5. Lægges 5—15 min. i 10 % iodkal.
6. Afvaskes i vand.
7. Kanadabalsam.

Overfarvning af guldpræparater kan delvis forhindres ved at lægge dem nogle dage i alkohol (Ranvier).

Man kan ogsaa affarve overfarvede guldpræparater i en svag opløsning af blodludsalt (Redding) eller 0,5 % cyankalium (Cybulsky). (Efter Lee & Henneguy.)

Guldpræparater kan enten undersøges straks i glycerin (helst tilsat 1 % myresyre), eller de kan hærdes i alkohol, indstøbes, skjæres, kjernefarves (safranin, methylengrønt) og indleires i kanadabalsam.

Osmiumsyre.

Farver i friske præparater fedt (celler, draaber) samt myelin sort, i opløsninger fra 1 % nedover; ogsaa i blandinger som Flemmings vædske (se side 84). Farvningen bør foretages i mørke. Det osmerede fedt er uopløseligt i alkohol, ja blir ved alkoholindvirkning endog yderligere modstandsdygtig mod andre opløsningsmidler. Alkohol gjør endvidere sværtningen af det osmerede fedt intensere; efterbehandling med alkohol bør derfor foretages, hvor man ønsker en meget præcis osmering.

Osmering foretages saaledes:

1. Smaa friske vævstykker lægges 24 timer i 1 % osmiumsyre eller Flemmings vædske.
2. Udvaskes godt i rindende vand 6—12—24 timer.
3. Efterhærdes i alkokol.

Er præparatet for sterkt sværtet, kan det osmerede fedt opløses ved 3—4 timers behandling med ozoniseret terpentin (terpentin som en tid har været udsat for sollysets indvirkning), æther eller xylol. Lettest lykkes denne reoxydation efter behandling med Flemmings vædske, vanskeligt efter anvendelsen af ren osmiumsyre. (Dickhuysen, Flemming).

Ogsaa ved nogle minuters ophold i

Vandstofhyperoxyd	1
Alkohol 70 % . .	10—25

kan osmeret fedt afbleges (Overton).

Efter fuldendt osmiumsyrefarvning og udvaskning kan kjernefarvning (ev. dobbeltfarvning) foretages enten med hæmatoxylin (og eosin) eller med en anilinfarve, specielt safranin (karmin er mindre heldigt). For at gjøre kjernefarvningen tydeligere, kan det osmerede fedt tilslut delvis udtrækkes.

Flemming udfører fedt-kjernefarvning saaledes:

1. Friskt fedtholdigt væv farves mørkt 24 timer i Flemmings krom-osmium-eddikesyre (se side 84).
2. Udvaskes 24 timer i vand.
3. Farves i safranin efter Böttcher-Hermanns methode (se side 121).
4. Gjøres vandfrit i absolut alkohol.
5. Behandles med ozoniseret terpentin 3—4 timer.

Marchis methode til farvning af degenerationer i centralnervesystemet.

1. Ganske smaa stykker frisk substans (hjerne, rygmarv) hærdes 8 dage eller mere i Müllers vædske.
2. Farves 8 dage i

   Osmiumsyre 1 % . 1
   Müllers vædske . . 2

3. Udvaskes godt i vand.
4. Efterhærdes i stigende alkoholer.
5. Indstøbes i celloidin, snit monteres i kanadabalsam.

Degenererede partier er sorte, alt andet er graat.

Stundom kommer der generende mørke nedslag paa præparaterne. Disse kan efter Teljatnik undgaaes, hvis man begynder med svag osmiumsyre-Müller og gradvis stiger, samt tilslut behandler præparaterne med hypermang. kalic. og oxalsyre, som ved Pals nervefarvning (se side 134).

Oplægning af præparater. Montering.

Det færdige præparat, det være sig enkelte isolerede vævsdele eller hele snit, farvede eller ufarvede, anbringes paa objektglasset og dækkes som regel med et dækglas til undersøgelse og opbevaring. Hvilket medium gjenstanden umiddelbart skal omgives af (serum, saltvand, glycerin, kanadabalsam o. s. v.), afhænger saavel af objektets natur og foregaaende behandling som af undersøgelsens formaal.

Ganske friske, ikke fixerede, objekter undersøges bedst i de side 78 omtalte undersøgelsesvædsker.

Særlig ved ufarvede snit maa tages hensyn til, at enkelthederne i regelen træder bedst frem i de svagt lysbrydende medier (methylalkohol, saltvand, glycerinvand), medens de tildels ganske kan svinde i de sterktbrydende medier som kanadabalsam.

Derimod fremtræder i balsam o. l. alle farvede partier (kjerner, mikroorganismer o. s. v.) med en meget tiltalende skarphed. Saadanne kanadabalsampræparater foretrækkes derfor gjerne af begynderen for de mindre straalende glycerinpræparater, der dog ofte virkelig aabenbarer mere af objektets struktur.

En anden sag er det, at kanadabalsampræparaterne er mere holdbare og lettere at opbevare.

Meget fine og skrøbelige objekter, der kan befrygtes selv i undersøgelsesvædsken at ville lide under trykket af dækglasset, beskyttes ved at dette holdes oppe ved et kort stykke af et haar, eller af et andet dækglas. Dækglasset kan ogsaa lægges paa voksfødder ɔ: 4 smaa vokskugler eller draaber anbragte paa forhaand en under hvert hjørne af dækglasset; herved fremkommer under dette et kammer, som ved et let tryk kan gives den forønskede høide. Ogsaa ved en paa objektglasset anbragt ramme af voks, segllak, asfaltlak, maskelak, goldsize o. lign. kan man danne et saadant kammer. Denne ramme bør være tør, før den tages i brug.

Skal et i vandige opløsninger eller andre flydende stoffe monteret objekt opbevares, bør det indrammes for at forebygge fordampning fra dækglassets kanter, og hindre at dækglasset forskyves.

Man indrammer i de ovenfor nævnte stoffe (voks, segllak, asfaltlak, goldsize eller kanadabalsam) foruden i forskjellige blandinger. For længere tids opbevaren er asfaltlak og maskelak samt goldsize at foretrække.

Før indrammingen sikrer man sig, at objektglas og dækglas er ganske rene og tørre. Vædsken under dækglasset maa helt fylde rummet uden at indeholde luftblærer og uden at trænge frem udenfor randen, end sige ovenpaa dækglasset.

Luftblærer fjernes ved at objektglasset forsigtigt varmes over en liden flamme eller over en rugeovn, idet det samtidig holdes lidt skraat, saa luftblæren stiger op og undviger under dækglassets øverste kant. Eller man løfter dækglasset forsigtig med en naal, som meget skraat skyves ind under den ene rand, medens den anden naal støtter imod paa den modsatte side, bevægelsen gjentages, til alle luftblærer er undvegne.

Vædske udenfor dækglassets rand borttages med en linklud; draaber paa dækglassets overflade bortsuges forsigtigt med filtrerpapir eller bortblæses med en som blæserør anvendt pipette, under hvilken der fordelagtigt stilles en spiritusflamme saa luftstrømmen opvarmes.

Indrammingen foregaar i to tempo. Først trækkes paa objektglasset ved hjælp af en pensel en stribe af det seigtflydende stof rundt dækglasset og lige i dettes rand, dog uden at røre det. Dernæst trækkes en lignende stribe, som gaar 1—2 mm. ind paa dækglasset og samtidig naar over paa den først lagte stribe, hvorpaa præparatet henlægges til tørring.

Ved runde dækglas bruges en slags dreieskive, hvorpaa objektglasset sættes i hurtig omdreining, medens penselen holdes stille langs kanten af dækglasset, medens den afgiver klæbestoffet.

Ganske praktisk og letvindt er indramming i voks. Et stykke voksstabel eller tyndt vokslys (julelys) helst med blød snoet, ikke flettet væge, antændes, saa der dannes ca. 1 cm. lang væge, slukkes da, og med vægen som pensel trækkes paa den ovenangivne maade det smeltede voks rundt dækglasset, hvor det straks størkner. Denne maade er væsentlig beregnet paa præparater, der kun skal gives en foreløbig beskyttelse; dog kan den, godt udført, bevare præparaterne i flere aar og se meget elegant ud.

Sikrere er man dog med de øvrige stoffe. De bør ikke være for tyktflydende, asfaltlak og goldsize kan om fornødiges fortyndes med terpentin, maskelak med absolut alkohol, kanadabalsam med terpentin eller xylol.

Rammen kan fra først af gjerne være lidt tyk, den tørrer med tiden altid ind til rimelige dimensioner.

Indlægning i kanadabalsam.

Kanadabalsam er en glasagtig, haard, klar, gul harpiks, der oftest forekommer i handelen opløst i xylol, terpentin eller kloroform til en syrupstyk masse. Xylol-kanadabalsam er den for farver og præparater mest uskadelige.

I stedet for kanadabalsam bruges ogsaa Damarfernis (opløst i lige dele benzin og terpentin og inddampet til syrupskonsistens, Flemming). Den gir mindre varige præparater end kanadabalsamen, men viser finere detaljer.

Præparaterne skal fuldstændig gjennemtrænges og omsluttes af balsamen. Derfor maa først alt vand udtrækkes af præparatet (deshydreres), dernæst maa dette gjennemtrænges med xylol eller en ætherisk olje (opklares), for at balsamen lettere kan komme ind. Det opklarede præparat bringes paa objektglasset, den overflødige olje borttørres, en draabe xylol-kanadabalsam dryppes derpaa, og det hele dækkes med dækglas. Balsamen er i den første tid ganske blød, saa dækglasset let kan forskydes, men blir med tiden glashaard; naar opløsningsmidlet (xylolen) ved forsigtig opvarmen over en lampe eller bedst paa en thermostat fordamper, ikke over 50—55° C., indtræder denne størknen inden kort tid. (Man kan ogsaa anvende fast — ikke opløst — kanadabalsam, opvarme den i en blikskaal, til den smelter, og dryppe den smeltede masse paa præparatet. Den blir da haard paa faa minuter, særlig naar den lægges paa en kold glasplade eller lignende).

Deshydreringen (vandudtrækningen) maa gjøres omhyggelig, da rester af fugtighed i præparatet hindrer indtrængningen af opklaringsmidlet og balsamen og foranlediger ugjennemsigtige, ved reflekteret lys melkede flekker i præparatet, som da ogsaa snart ødelægges. Optræder saadanne flekker, maa deshydreringen gjentages.

Det er ikke altid nødvendigt at bruge absolut alkohol; ogsaa 96 % og derover kan anvendes. Man maa anvende tilstrækkelig mængde og erindre, at denne maa øges med præparaternes størrelse (tykkelse) og antal, samt at brugt absolut eller 96 pct. alkohol ikke længere er absolut ei heller 96 pct. Alkoholen maa derfor jevnlig skiftes ved længere arbeide, dog kan den brugte abs. alk. benyttes til foreløbig udvaskning.

Absolut alkohol opløser celloidin, hvorved præparatet dels kan tage skade, dels blive vanskeligere at behandle. Ved celloidinpræparater anvendes derfor benzin-alkohol (Weigert) ɔ: absolut alkohol + benzin lige dele, eller kloroform-alkohol, hvorved alkoholen fortyndes til uvirksomhed ligeoverfor celloidinen uden at tabe sin evne til at optage vand.

En anden deshydreringsvædske er:

Xylol 3
Acid. carbol pur . . . 1
Sulphat. cupr. usti q. s.

til at holde vædsken vandfri.

Mulige knæk og folder i snittet bør glattes ud, før det overføres i abs. alk., da det her og end mere i de fleste opklaringsvædsker blir saa haardt, at senere udglatning er meget vanskelig. Præparaterne bør derfor føres fra den ene vædske til den anden fladt udbredt paa spatel. Denne bør, overalt hvor præparatet passerer fra den ene vædske til den anden, omhyggelig aftørres paa filtrerpapir for at undgaa forurensning.

Til opklaringen anvendes xylol eller forskjellige ætheriske oljer, især terpentin, nellikolje, bergamot-, origanum- eller cederolje. Disse stoffe har noget forskjellige egenskaber og kan ikke bruges ganske i flæng.

Xylol, tyndtflydende, fordamper let, opløser godt paraffin, har ingen indflydelse paa celloidin, uskadeligt for anilinfarver. Fordrer meget nøiagtig udtrækning af vand (byt alkohol!), bringer let præparatet til at skrumpe.

Terpentin ($n = 1{,}473$). Opløser paraffin, oxyderer og opløser osmeret fedt. Ingen indflydelse paa celloidin; angriber anilinfarver og i nogen grad Weigert's nervefarvning. Fordrer nøiagtig vandudtrækning, præparaterne blir haarde og skrumper noget.

En blanding af

Terpentin . 2
Ol. ricini . 1

er ganske behagelig at arbeide med.

Cederolje ($n = 1{,}510$) lys gul (maa ikke forveksles med den indtykkede til immersionslinserne. Ingen indflydelse paa celloidinen eller paa anilinfarver. Ikke meget ømfindtlig for vand. Trænger meget langsomt gjennem celloidinen.

Bergamotolje ($n = 1{,}464$). Neutral lige over for celloidin og anilinfarver undtagen van Giesons farvning. Taaler svage vandrester i præparatet (udtrækning med 95 pct. alkohol), som det gjennemtrænger meget hurtigt. Udmærket opklaringsmiddel.

Origanumolje (ætherol. orig. creticum) omtrent som bergamotolje, extraherer dog lidt anilinfarver.

Nellikolje ($n = 1{,}533$). Opløser celloidin hurtigt, extraherer anilinfarver, gjør præparatet noget skjørt, taaler endel vand i præparatet. Bruges derfor gjerne, hvor man af en eller anden grund ønsker at fjerne celloidinen eller at udtrække rester af anilinfarver af præparatet (kfr. slimfarvning).

Ved enkelte specielle methoder anvendes desuden til vandudtrækning anilinolje, kreosot og karbolsyre, ren eller med xylol.

Bergamotoljen vil vise sig hensigtsmæssig til de fleste formaal, men er noget dyr. Man greier sig ogsaa godt med xylol; desuden bør man altid holde lidt nellikolje færdig.

Flere af de ætheriske oljer, f. eks. terpentin, bergamot- og nellikolje, har den evne at kunne opløse nogle af farvestoffene, saasom pikrinsyre, eosin, methylenblaat. Man benytter denne

evne (Nansen, Johne) til at indføre disse farver i objektet samtidig med opklaringen, altsaa paa et meget sent stadium af behandlingen (se s. 128 og 138). Man tillaver disse farveholdige ætheriske oljer ved til den rene olje at tilsætte draabevis en stærk opløsning af farvestoffet i absolut alkohol, indtil den forønskede styrke er opnaaet.

Det saaledes opklarede snit overføres med spatel paa objektglasset, den overflødige ætheriske olje fjernes ved hjælp af lidt filtrerpapir, som med et behændigt fast tryk gjerne kan presses over præparatet; en draabe kanadabalsam (xylol-kanadabalsam) dryppes derpaa, dækglasset lægges derover, og præparatet er færdigt til undersøgelse.

Luftblærer fjernes, før dækglasset lægges paa, ved at berøres med spidsen af en i flamme opvarmet naal, efter dækglassets paalægning ved forsigtig opvarmning over flamme.

Arbeidsgangen ved indleiring i kanadabalsam blir saaledes:

1. Deshydrering af snittene 1—5 min. i rigelig absolut eller 96 pct. alkohol. Celloidinsnit i benzinalkohol eller anilinkarbolsyre (s. 176).
2. Opklaring i xylol eller i ætherisk olje, i tilfælde tilsat en kontrafarve. Opklaringen er færdig i faa sekunder.
3. Overføres paa objektglas, overskydende olje fjernes, en draabe xylol-kanadabalsam tilsættes, dækglas.

Som tidligere omtalt spiller lysbrydningsevnen hos indleiringsmediet stundom en ikke uvæsentlig rolle ved undersøgelsen af fine ufarvede strukturer, hvor det gjælder at gjøre disse synlige ved brydningsdifferenser (diatomeer f. eks.). Nedenfor leveres en fortegnelse over en række saadanne medier (efter Dippel og van Heurch):

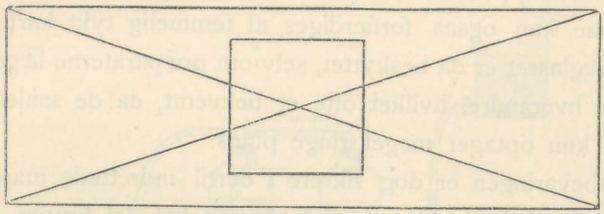
Methylalkohol	1.32
Saltvand	1.33
Sol. acetat kal. 50 %	1.37
Glycerinvand ana	1.39
Glycerin	1.47
Kanadabalsam	1.54
Anisolje	1.56—1.62
Styrax	1.6
Svovlkulstof	1.65
Monobromnaftalin	1.66
Kviksølvjodid i iodkaliumopl.	1.682
Methyliodid	1.743
Svovl opl. i svovlkulstof	1.75

Methyliodid med svovl til mætning 1.787
«Smiths gule medium»: realgar opl.
i tribromarsen 2.4
«van Heurcks medium»: arsenik opl.
i svovl + svovlbromid 2.4

Efter omstændighederne kan under dækglasset anbringes et eller flere snit, der altid maa anbringes symmetrisk og ordentligt.

For at sikre sig et pynteligt udseende af præparatet og en vis uniformitet i ens hele arbeide, er det hensigtsmæssigt paa en karton at aftegne et objektglas, trække op begge diagonaler, hvorved midtpunktet angives, og endelig tegne omridsene af et dækglas her.

Fig. 71.



Under monteringen lægger man objektglassene paa tegningen og ved da nøiagtigt, hvor præparaterne skal lægges.

I længden lønner det sig bedst at iagttage en streng orden og pyntelighed ved udførelsen af objekterne. Slurveri i det ydre udstyr er ikke sjelden et udslag af slurveri i den hele behandling.

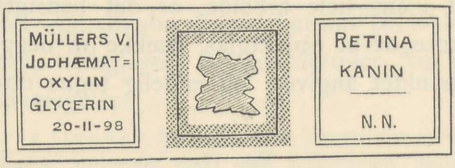
Signering og opbevaring af præparaterne.

Det færdige præparat bør straks forsynes med paaskrift, dels foreløbig ved hjælp af glasblyant (eller med pen og blæk), bedst ved paalimede etiketter. Ubetegnede præparater er en uting; altfor ofte har man efter nogen tid glemt det

væsentlige ved dem, hvortil de egentlig hører, og de blir en kilde til uorden og ærgrelse.

Signeringen bør indeholde angivelse af den dyrespecies og det organ eller den vævsgruppe, hvorfra præparatet stammer (ved pathol. præp. ogsaa sygdomsformen), dssuden præparationsmethoden, tiden naar det er forfærdiget, samt gjerne autors navn. Der bruges til dette helst to vignetter.

Fig. 72.



Disse kan ogsaa forfærdiges af temmelig tykt karton eller pap, dækglasset er da beskyttet, selv om præparaterne lægges lige ovenpaa hverandre, hvilket ofte er bekvemt, da de saaledes opbevaret kun optager meget ringe plads.

Opbevaringen er dog sikrere i dertil indrettede mapper og etuier, hvoraf der nu for tiden findes en hel del former. Bedst er de, hvor præparaterne ligger fladt og horizontalt; det maa erindres, at nylavede præparater ikke maa sættes paa kant, saalænge kanadabalsamen ikke er størknet, eller dækglasset ved glycerinpræparatet ikke er fæstnet ved rammen.

Tillæg.

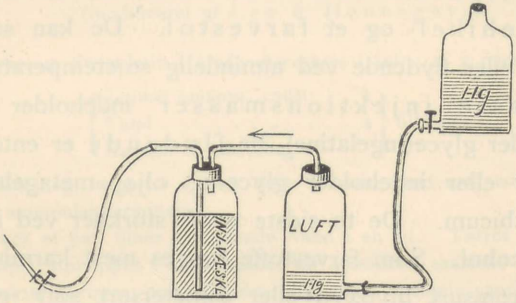
Injektioner

foretages for derved at undersøge karfordelingen i vævet og organerne, eller ogsaa kjertelgangene, som fyldes med farvede opløsninger. Disse kan enten være flydende ved almindelig stuetemperatur eller maa først opvarmes til smeltning, før de kan injiceres, hvorefter de da atter størkner i karrene.

Til injektionen benyttes enten haandsprøite, eller injektionstrykket udøves af en kviksølv(eller vand)søile. Den sidste methode giver et jevnere og finere regulerbart tryk, dog kan man med nogen øvelse opnaa meget gode resultater ogsaa med haandsprøite. Trykket maa ikke være for sterkt, da det ellers let fremkalder bristninger af de smaa kar og udtrædelse af injektionsvædsken ud i vævet.

Sprøitens stempel maa slutte nøiagtig men desuagtet vandre let; den hele sprøite bør let kunne renses. Den bør være udstyret med kanuler af forskjelligt kaliber til de forskjellige kar, fra ca. 2—1/2 mm. Kanulerne forbindes med sprøiten enten

Fig. 73



direkte eller ved hjælp af en kort koutschoukslange, der gjør apparatet bevægeligere og bekvemmere. Ved en hane i kanulen eller en büretteklemme om koutschoukrøret bør kanulen kunne lukkes, saa at sprøiten kan, om fornødiges, fyldes paany, uden at den injicerede masse rinder ud igjen.

Kanulen, hvis spids for de grovere kalibere gjerne har en liden knop eller en ydre skruegang, fæstes i karret (arterie eller vene, kjertelgang) ved at ombindes med en traad.

Det er hensigtsmæssigt før injektionen at udskylle karsystemet med fysiologisk saltvand (0,75 pct.) af 35—37° C. for at fjerne det indeholdte blod.

For at undgaa en ofte meget generende, ved selve injektionen bevirket kontraktion af karrene foreslaar Oriatt og Sargent at anæsthesere dyret

med en blanding af æther og amylnitrit, som udvider karrene, og tilslut dræbe det med ren amylnitrit, ligeledes kan der tilsættes lidt amylnitrit til selve injektionsmassen, i det samme den skal bruges (Lee & Henneguy).

Ved anvendelse af injektionsmasser, der størkner i almindelig værelsetemperatur, maa under operationen selve sprøiten indhylles i opvarmede klude, ligesom dyret eller organet holdes varmt paa samme vis eller ved at anbringes i vand- eller sandbad af ca. 50° C. Vedkommende karomraade maa selvfølgelig være helt, og vel begrænset, saa injektionsvædsken ikke flyder ud gjennem tilfældige læsioner.

Et arrangement for kviksølv- eller vandtryk viser fig 73.

Til disse apparater kan dog kun bruges koldtflydende injektionsvædsker.

Injektionsmasserne er sammensat af en grundmasse (vehikel) og et farvestof. De kan som omtalt være faste eller flydende ved almindelig stuetemperatur.

De faste injektionsmasser indeholder i regelen gelatine (eller glyceringelatine), de flydende er enten vandige opløsninger eller indeholder glycerin, olje, metagelatine eller gummi arabicum. De to sidste stoffe størkner ved indvirkning af sterk alkohol. Som farvestoffe bruges mest karmin, berlinerblaat og kromsurt blyoxyd eller salpetersurt sølv (gule); ligeledes japanesisk tusch.

Robin angiver følgende tilberedelse for gelatinemasse:

Fin gelatine . . . . . 1 del
opblødes nogle timer i vand
opløses derpaa paa vandbad i vand 7—10 dele.

For at gelatinen skal holde sig, dækker man overfladen i det kar, hvori den opbevares, med et tyndt lag absolut alkohol. Gelatinen blir da tidt opak, men klarner atter ved opvarmning

Til 3—4 dele af denne masse blandes 1 del af følgende farveblandinger.

Robins karmin.

Karmin 3
udgnides i en skaal med lidt ammoniak
og vand til opløsning. Tilsættes
Glycerin . . . . . 50, filtreres.

Hertil sættes under omrøring

Acid. acetia 3

Glycerin 45

til let sur reaktion.

1 del deraf til Robins gelatine- eller glycerinmasse.

Robins berlinerblaat.

Mættet opl. af svovlcyankalium . . . . . 90 cc

Glycerin . . . . . 50 »

blandes langsomt i

Jernsesqviklorid . . . . . 3 »

Glycerin . . . . . 50 »

1 del heraf til 3—4 dele af Robins gelatine- eller glycerinmasse.

Fol's karmingelatine

(modificeret af Lee & Henneguy).

Et kvantum fin gelatin i blade macereres i løbet af 2 dage i overskud af

{ Liquor ammon. caust . . 1
{ Vand . . . . . 4 } filtreret
{ Karmin til mætning

skylles i vand, og lægges i et par timer i vand syret med eddikesyre for at neutralisere ammoniakkarminen.

Udvaskes et par timer i rindende vand i en sil. Tørres paa voks- eller pergamentpapir, opklippes i smaastrimler og opbevares saaledes

Skal massen bruges, opblødes den i en liden mængde vand nogle minuter og smeltes paa vandbad i 10—20 gange saa meget vand som gelatine.

Thiersch's berlinerblaatgelatine.

Man laver først:

A. En mættet vandig opl. af sulphas ferros.

B. En » » » af rødt blodludsalt.

C. En » » » af oxalsyre.

D. En opl. af 1 del gelatine i 2 dele vand.

12 cc af opl. A (svovlsurt jernoxyd) blandes i en skaal med 30 cc gelatinopl. D ved 30° C.

Dernæst blandes i en anden skaal ved samme temperatur 24 cc af opl. C (rødt blodludsalt), 60 gr. gelatinopl. D og 24 cc oxalsyreopl. under god omrøren. Begge skaalers indhold slaaes derpaa sammen, røres godt om ved en temperatur af ca. 30° C., til alt berlinerblaat er udfældt. Dernæst opvarmes det til ca. 80—90° C. og filtreres gjennem flanel (varmtvandstragt er her fordelagtig).

Thiersch's blykromat-gelatine (gul).

Man laver:

A. En opl. 1 del gelatine i 2 dele vand.

B. En opl. af 1 del neutralt kromsurt kali i 11 dele vand.

C. En opl. af 1 del salpetersurt blyoxyd til 11 dele vand.

4 dele af gelatinopl. A blandes i en skaal med 2 dele af blyopl. C.

I en anden skaal blandes 4 dele gelatinopl. med 1 del kromsur kali opl. B.

Opvarmes til ca. 30° C., begge skaalers indhold blandes under stadig omrøren, indtil alt blykromat er udfældt. Opvarmes til ca. 80—90° C., filtreres gjennem flanel.

Maa anvendes friskt tillavet, da massen temmelig snart blir uopløselig i vand.

Alle gelatinmasser maa som omtalt injiceres i varm tilstand. Efter injektionen blir præparatet hurtigt afkjølet i koldt vand, dernæst hærdet i alkohol, formol, Müllers vædske.

Da opvarmningen af organer, injektionsvædske og instrumenter er omstændelig og besværlig, har man søgt at finde koldtflydende injektionsmasser, der med eller uden senere ved hærdning fæster sig godt i karrene.

Fol's metagelatine.

Koges en almindelig gelatinopløsning med lidt ammoniak i flere timer, taber den sin evne til at størkne ved afkjøling alene, den kaldes da metagelatine.

Til denne flydende masse kan man nu sætte opløsninger af karmin, berlinerblaat, kromgult, som ovenfor nævnt, og fortynde i den grad som ønskes med tynd alkohol.

Efter injektionen lægges stykkerne i sterk alkohol eller i kromsyre, hvor metagelatinen størkner.

Taguchis tuschinjektion.

Kinesisk eller bedre japanesisk tusch udrives med vand, til vædsken er saa koncentreret, at en draabe deraf paa filtrerpapir holder godt sammen og ikke gir nogen graa ring i periferien. Præparatet injiceres, til det er ganske sort. Det maa efter injektionen ikke komme i vand, men straks lægges i hærdningsvædsker. Kan dog undersøges i glycerin, farves i alle farvestoffe.

Hoyers oljemasse med berlinerblaat.

Berlinerblaat i tuber (faaes i enhver malerhandel) 5.00
rives godt i en morter med
Kogt linolje 5.00
tilsættes dernæst med
Lavendelolje 30.00
under stadig omrøren.

Istedetfor lavendelolje kan ogsaa bruges fennikel-, timian- eller rosmarinolje. Blandingen hensættes 12—24 timer i en vel korket flaske til bundfældning, den øverste klare portion afhældes og holder sig da i lang tid. Bør rystes før brugen.

Trænger let ind baade i lymfe- og blodkar. Er af Hoyer brugt til milt- og nyreinjektioner.

Efter injektionen hærdes i absolut alkohol, der extraherer oljen og efterlader farvestoffet som et belæg paa karrenes indside.

Robins koldtflydende injektionsmasse.

Glycerin . . 2
Alkohol . . 1
Vand 1

2 dele af denne masse blandes med 1 del af Robins karmin eller Robins berlinerblaat (se side 183).

Injektion af lymfekarrene udføres bedst, idet sprøitespidsen stikkes ind i vævet.

Som injektionsmasse anvendes sølvnitrat 1 pct., olje, eller følgende af Regaud meget anbefalede blanding.

Mættet vandig pikrinsyreopl. . . . 80 cc
Osmiumsyre 1 pct. . . . . 20 cc
Sølvnitratopl. 1 pct. . . . . 25 cc

Forholdet mellem disse stofte kan dog variere lidt.

De ovennævnte injektionsstoffe er stundom noget omstændelige at tilberede. De erholdes færdige hos G. Grübler & Co., Leipzig.

Arbeidsordningen

for et fuldt færdigt snitpræparat bliver saaledes

1. Fixering og hærdning af det friske væv (s. 82 og flg.).
2. Indklemmen (s. 95), eller indstøbning i celloidin (s. 99) resp. paraffin (s. 101).
3. Snitskjæring (s. 112), seriesnit (s. 115).
4. Farvning (s. 119). (Farvning en bloc foretages lige efter hærdningen paa ikke indstøbt præparat.)
5. Oplægning (montering) paa objektglas.
   a. i glycerin, acetat. kalicus-opl. osv., hvor dækglasset om ønskes omrandes med voks, maskelak osv. (s. 173) eller
   b. deshydreres (s. 175), opklares (s. 176) og indleires i kanadabalsam eller domafernis (s. 178).

TREDIE AFSNIT.

SPECIELLE UNDERSØGELSESMETHODER.

A. Normale objekter.

Cellen.

Den levende celle undersøges lettest hos encellede eller andre smaa og lavtstaaende, eller dog koldblodige dyr. Varmblodige dyrs celler maa undersøges i deres normale legemstemperatur ved hjælp af varmebord (s. 7). Vedkommende dyrs eller celleforms naturlige opholdsmedium (søvand, serum) bør om muligt bruges, eller ogsaa de indifferente undersøgelsesvædsker (s. 78).

Som materiale anvendes alger og protozoformer, tillige cellerne i den tynde halefinne hos unge frosk- eller salamanderlarver. Man bedøver disse i tyndt kloroformvand, tobakinfus, æther-alkohol ana 3 i vand 100, og dækker larven paa mikroskopbordet med fugtigt filtrerpapir. Efter undersøgelsen lægges larverne atter i vand og kommer til live igjen efter 3—4 timer.

Amøboid bevægelse. Kornea hos en frosk skrabes med en kniv, saa der fremkommer et substanstab. Efter 24

timer er kornea uklar paa grund af den indtraadte hornhindebetændelse, dyret dekapiteres, kornea udklippes og presses let i den paa objektglasset opfangede kammervædske. Kontinuerlig iagttagelse gjennem flere timer vil vise talrige amøboide formforandringer.

Flimmerbevægelse. Stykker af gjellebladene hos østers, blaaskjæl (mytilus) o. l. bredes paa objektglas i søvand. Kraftig og regelmæssig flimmerbevægelse. Ogsaa det af froskens svelg udskrabede epithel kan bruges. Naar bevægelsen begynder at aftage, kan en ganske let opvarmning af objektglasset atter friske den op en tid.

Øieblikkelig stansning af cellebevægelsen og fixering af den levende celle bevirkes enten ved tilsætning af en draabe 1 pct. osmiumopl. ved dækglassets kant, eller ved osmiumsyredamp, idet præparatet uden dækglas vendes over en aaben osmiumsyreflaske.

Farvning af levende celler foregaar kun vanskeligt (ifølge Lee & Henneguy er der ved al vital farvning kun tale om en imbibation). Friskt væv kan bedst farves i

Sterk opl. af methylgrønt
tilsat
Osmiumsyre . 0.1—1 pct.
Eddikesyre . . 1 »

opbevares i let eddikesyret glycerin, hvori lidt methylgrønt.

Ogsaa bismarkbrunt, nøitralrødt kan bruges.

Kjernedelingen, karyokinesen. Bedste materiale findes hos planterne, særlig er cellerne i embryosækken hos liliumarter (tritillaria imperialis) og lignende gode. Endvidere testis af salamander og triton indsamlet i befrugtningstiden, eller ogsaa det tynde epithellag i munden, paa gjellebuer eller halefinnen hos unge triton- og salamanderlarver. Forøvrigt ogsaa alle væv med livlig celleproduktion: testis i brunsttiden, epidermis i svinetrynet, hurtigt voksende svulster o. s. v.

Materialet maa tages ganske friskt og straks blive tilbørlig fixeret; mitoserne svinder hurtigt efter døden og er allerede efter $^1/_2$ times forløb sammenskrumpede.

Smaa dyr (salamanderlarver osv.) dræbes ved at slippes direkte i fixeringsvædsken, stykker af nys dræbte dyr bør helst komme endnu livsvarme i samme.

Undersøgelsen paa kjernedelingsfigurer udføres saaledes:

1. Fixation af smaa stykker ikke over 0.5 ctmt.s side i Flemmings eller Fols vædske (s. 84), Rabls krom-myresyre, Heidenhains sublimat (side 84, 85).
2. Grundig udvaskning i vand, stigende alkoholer (s. 91). Ved sublimathærdning tilsættes lidt iodiodkalium for bedre at udtrække sublimatet.
3. Indstøbning i paraffin eller celloidin (s. 99), om fornødiges (s. 101), skjæring. Tynde snit! ikke over 10 μ (tynde epithelmembraner skjæres selvfølgelig ikke).
4. Farves i safranin $^1/_2$—12—24 timer efter Böttcher-Hermann (s. 150) eller i Löfflers methylenblaat (s. 150), i Ehrlichs methylviolet (s. 146), i Böhmers hæmatoxylin (s. 130), Delafields hæmatoxylin (s. 131), Mayers hæmalun (s. 131), Benda (Heidenhain-Piersol) hæmatoxylinmethoder (s. 136—137).
5. Indleires i kanadabalsam, eller hvor ogsaa den akromatiske kjernespol ønskes fremhævet, i glycerin eller ved anilinfarver i 50 pct. eddikesur kali.

Bizzozero har anbefalet Grams farvning (s. 147) til mitosefarvning med $^1/_2$ minuts fixering i 1 ‰ kromsyre efter udvaskningen i absolut alkohol. Efter udvaskningen deshydrering, nellikolje, kanadabalsam.

Ved alle disse farvninger vil kromatinnættet fremtræde skarpt tegnet; og de i deling værende kjerner vil desuden antage en kraftigere farvning end de hvilende. Denne forskjel i farveevnen kan yderligere fremhæves ved

Kossinskis farvning af cellekjerner i deling og i hvile.

1. Tynde snit paa objektglas farves svagt i Böhmers eller Dalefields hæmatoxylin.
2. Vaskes 3–4 minuter i 1 pct. alunopløsning.
3. » 5 » i vand.
4. » 1—3 » i alkohol.
5. Farves 20—30 minuter i 0.5 % vandig safranin.
6. Udvaskes 3—5 minuter i absolut alkohol.
7. Opklares, kanadabalsam.

Hvilende kjerner er da blaaviolette, karyokineter intens røde.

Den akromatiske kjernespol undersøges efter Bendas eller efter Benda-Heidenhains methode med hæmatoxylin (s. 136) ligeledes efter følgende:

Hermanns methode.

1. Friskt væv fixeres 1—2 dage i

Platinkloridopl. 1 pct. .	15
Osmiumsyre 2 pct. . .	4
Iseddike	1

2. Udvaskes i rindende vand.
3. Hærdes i stigende alkoholer (50, 80, 94 pct.).
4. Lægges 12—18 timer i træeddike.
5. Paraffinindstøbning, montering paa dækglas. Farvning unødvendig.

Altmanns granula. Den ovenfor s. 155 angivne methode er af Weiss-Rosenstadt yderligere udarbeidet saaledes:

1. Friskt væv fixeres 24 timer eller mere i

Bikrom. kali-opl. 5 pct.	lige dele.
Osmiumsyre 2 pct.	

friskt tilberedt, maa ikke indeholde fri kromsyre.

2. Udvaskes 24 timer i rindende vand.
3. Hærdes i 70 pct. alkohol, siden i absolut.
4. Indleires i paraffin, skjæres tyndest muligt, 1—3 μ. Snittene klæbes paa dækglas med Mayers æggehvide-glycerin (s. 118), paraffinen fjernes med xylol under let opvarmning og vaskning med abs. alkohol.
5. Farves paa objektglasset under forsigtig opvarmning, til lette dampe opstaar, i

   Altmanns syrefuchsin:

Syrefuchsin . .	20
Anilinvand . .	100

6. Affarves og kontrafarves $^1/_4$—$^1/_2$ minut i

Methylenblaat . . .	2
Salpetersyre 10 pct.	100

7. Afvaskes hurtigt i abs. alkohol. Bergamotolje eller xylol, kanadabalsam.

Epithel.

Pladeepithel. Materiale fra de øverst liggende cellelag erholdes ved let skrabning paa mundslimhinden med en kniv eller spatel. Undersøgelse i lidt saltvand uden farvning.

Dybere lag af de flerlagede epithelier sees bedst efter maceration af friskt udklippede stykker af mundslimhinde,

vagina eller blære. Man kan anvende 40 pct. kalilud i ca. 20 minuter, 30 pct. alkohol eller 1 pct. formol i 1—2 døgn. Efter macerationen bør epitheloverfladen dessocieres ved pillen med naale, eller epithelet løsnes ved smaa slag mod objektglasset eller ved rysten i et reagensglas. Celleformer i epidermis kan efter Schiefferdecker bedst isoleres ved maceration 3—4 timer med en mættet vandig opløsning af pancreatinum siccum, Wittie, ved legemstemperatur, derpaa udskyllen i vand og om ønskes opbevaren i Culberlas vædske (s. 80). Efter pillen med naale isoleres cellerne meget godt. De enkelte celler i haar og negle isoleres ved kort opvarmning i 10 pct. kalilud og pillen.

Cylinderepithel erholdes lettest fra tarmslimhinden ved maceration af ganske smaa stykker med 30 pct. alkohol, 1 pct. formol eller 10 pct. klornatrium.

Kjertelepithel (f. eks. leverceller) fremstilles ligeledes ved at macerere smaastykker af vedkommende organ i 30 pct. alkohol eller 1 pct. formol, eller kold mættet oxalsyreopløsning i 24 timer.

Til studiet af cellernes gjensidige forhold udkræves tynde snitpræparater af vedkommende organ.

Cellegrænser paa overfladen af epitheliale membraner kommer bedst tilsyne ved sølvimpregnation.

Membranen udspændes paa kork med træstifter eller over ringe, vaskes med vand, overdryppes med 2—3 ‰ opl. af salpetersurt sølv, til overfladen blir blakket, afvaskes en kort stund i vand og undersøges 1) i glycerin eller 2) hærdes (endnu udspilet paa kork) i absolut alkohol, kjernefarves i hæmalun, karmin o. s. v. Grænserne staar da som skarpe linier. Samme methode bruges ogsaa til endothelmembraner.

Bindevæv.

Fibrillært bindevæv. Det subkutane bindevæv paa fedtfrie steder hos unge dyr pilles omhyggeligt i saltvand slørformigt ud paa objektglasset; Ranviers halvtørre pillemethode, hvorved der kun tages saa meget vædske, at bindevævsfibrene forbliver strakte paa glasset, er ofte nyttig. Man ser fibriller, fibrilbundter og forskjellige celleformer i bindevævet.

Ved tilsætning af 2—5 pct. eddikesyre under dækglasset svinder den fibrillære struktur, medens cellerne (kjerner) og elastiske fibre træder tydeligere frem. Ligeledes kan herved paa isolerede, vel strukne bundter de cirkulære eller spiralliggende snorfurer komme frem. Eddikesyren dryppes langs den ene kant af dækglasset og suges under samme ved hjælp af et stykke filtrerpapir, som med glat afklippet kant anbringes ved dækglassets modsatte rand.

Et godt billede af bindevævets bygning faaes ved Ranviers artificielle ødem.

I corion eller det subkutane bindevæv paa et friskt udtaget hudstykke injiceres med en fin sprøite en kvantitet pikrokarmin *, der gjerne kan tilsættes ca. 1/4 pct. osmiumsyre, indtil der opstaar en liden fast opdrivning. Af denne udklippes et ganske lidet stykke, som hurtigt lægges under dækglas; det hele opbevares fugtigt under en klokke i 24 timer, overskud af farve fjernes med trækpapir, der tilsættes lidt 1 pct eddikesyre, dækglasset omgives med voksrand og undersøges efter yderligere 24 timers forløb.

Ogsaa ved injektion af 1 pct. nitr. argent. faaes gode billeder af bindevævet.

---

* Af de mange pikrokarminer skal her kun nævnes Ranviers og Weigerts, paa hvis noget tidsspildende og langvarige tilberedelse der ikke nærmere skal gaaes ind. Ranwitz angiver følgende mere letvindte tilberedning: Karmin 1, liqv. ammon. caust 5, vand 50 blandes indtil fuldstændig opløsning; tilsættes da mættet vandig pikrinsyreopløsning 50, hvorpaa vædsken hensættes i aabent kar, indtil al ammoniak er fordunstet. De andre pikrokarminer faaes færdige hos G. Grübler & Co., Leipzig.

Bindevævsbundter i krydsende nætformig anordning sees bedst i omentet (magre dyr).

Fibrøst bindevæv. Bindevævsfibriller fra sener og fascier isoleres, idet smaa stykker friske sener macereres i flere uger i mættet vandig pikrinsyreopløsning. Kan opbevares der aarevis. Pilles godt i glycerinvand.

Bindevævsceller sees i almindelige pillepræparater af friskt ungt bindevæv. Fremtræder tydeligere efter 12—24 timers farvning med pikrokarmin, tynd vesuvin eller methylgrønt (s. 144) under dækglas (s. 192). Waldeyer anbefaler subkutan injektion af 1 ‰ Dahlia-opløsning; efter 1 minut kan det udklippede stykke lægges under dækglas og undersøges; kun cellerne er da farvede.

Skovlceller (i sener) undersøges bedst i rotte- eller musehaler (Ranvier).

Halen afklippes ved roden, flaaes, med neglen afknibes et par halehvirvler ad gangen og udtrækkes, saa senerne hænger som løse trevler. Disse afklippes, lægges ½ time eller mere i pikrokarmin (s. 192 anmærkn.), udvaskes i vand, undersøges i myresyre- eller eddikesyreglycerin (s. 80). Pilles let og forsigtig ud paa objektglas; fibrene drives til nød lidt fra hverandre ved et let tryk paa dækglasset. De lange cellerækker og specielt kjærnerne kraftigere farvet end fibrillærsubstansen.

Hindeceller, endothelceller findes ofte friskt isoleret i den let plumrede vædske i de serøse huler især pericardiet; optages herfra med pipette (centrifugeres eller bundfældes om nødvendigt). Endothelceller i sammenhæng paa serøse membraner, kitlinierne mellem de enkelte celler undersøges ved sølvimpregnation; oment egner sig bedst (s. 192).

Bindevævets plasmaceller (maaske omdannede levkocyter) farves efter alkoholhærdning (kromsalte maa undgaaes) i Ehrlichs Dahlia (s. 144). Indleires i kolophonium-terpentin. Kun plasmacellerne beholder den blaa farve. Stærkt farvet kjærne, lys halo udenfor samme.

«Mastceller» (Ehrlich). Granulationerne i disse farves omtrent ved alle aniliner og beholder farven efter udvaskning med absolut alkohol og syrer. Mastcellernes kjærne farves ikke. De farvede granulationsmasser kan ligne bakteriehobe, men skiller sig fra disse ved at mastcellerne affarves ved efter-

følgende udvaskning med svag opløsning af kulsur kali, hvori de farvede bakterier beholder sin farve.

Unna angiver en samtidig dobbeltfarvning for plasmaceller og mastceller:

Methylenblaat . .	1
Kulsurt kali . . .	1
Vand	100

fortyndes med vand op til 100 gange. Snit farves heri 24 timer. Udvaskes i 70—80 pct. alkohol, aftørres paa objektglas med filtrerpapir, differentieres i styron, opklares i bergamotolje eller xylol; kanadabalsam. Plasmaceller er blaa, mastceller røde.

Elastiske fibre og membraner.

Elastiske fibre i subkutant bindevæv, korion, lungevæv bringes tilsyne med eddikesyre 2—5 pct. eller kalilud 1—2 pct., hvorved de øvrige vævsbestanddele ødelægges. De største elastiske fibre findes i lig. nuchæ hos oksen, maa pilles godt.

Farvning af elastiske fibre i friskt væv: tilsætning af fuchsinopl. (karbolfuchsin) ca. 5 min., derefter 1—2 pct. kalilud, dækglas. De elastiske fibre kraftig røde, blegrød bund.

I snit farves elastiske fibre til foreløbig undersøgelse (uden indstøbning) med alkoholisk eosin, differentieres i 40 pct. kali (Balzer). Skarpe og varige præparater faaes med Weigerts fuchsin-resorcin (s. 145), Taenzers orceïn (s. 140), Herxheimers hæmatoxylin-jernklorid (s. 137).

Elastiske membraner: flaaes med spidse pincetter fra stykker af væggen af et større kar, specielt aorta; lettere gaar dette efter maceration i 8—14 dage i Hayems vædske (s. 86); de elastiske (fenestrerede) membraner undersøges i tynd kali eller eddikesyreglycerin.

Slimvæv.

Bedste materiale embryoner, navlestreng eller placenta, helst af ufuldbaaret foster. Hærdning i Müllers vædske (s. 89) eller formol (s. 87). Efterhærdning i alkohol; celloidin. Snit farves i hæmatoxylin-eosin (s. 138).

Retikulært bindevæv.

Materiale: itler (milt, thymus, ung benmarv).

Lidt tykke frysesnit af en itle udpensles (s. 78) eller rystes i vand eller tynd alkohol (30 pct.), saa levkocyterne udfældes af vævet. Undersøges i glycerin, gjerne tilsat lidt eosin, som optages af fibrillerne, eller eddikesur kali. Ogsaa hærdet men ikke indstøbt materiale kan bruges, men maa pensles og rystes grundigere, Ranvier anbefaler hærdning i 12—24 timer i mættet pikrinsyreopløsning; hærdet materiale kan efter fjernelse af levkocyterne farves f. eks. i hæmalun-eosin, hæmalun-van Gieson; indleires i glycerin, eddikesur kali eller kanadabalsam.

Fedtvæv.

Fedtets lappede, drueklaselignende anordning sees bedst i magre individers oment eller underhudsbindevæv, der uden videre præparation udbredes paa objektglasset i saltvand eller glycerinvand.

Ved forsigtig pillen isoleres de enkelte fedtceller; maa ikke trykkes med dækglasset. Selve fedtet sværtes ved indvirkning af osmiumsyre, der samtidig gjør det uopløse-

ligt i de vanlige fedtløsningsmidler, abs. alkohol, æther o. s. v. Osmiumsyre bruges derfor til paavisning af fedt. Stærkest blir sværtningen efter paafølgende alkoholhærdning.

Kjærne og protoplasma lader sig lettest paavise paa isolerede fedtceller, da de her mindre vil forveksles med kjærnerne i kapillærkarrene.

Flemming anbefaler følgende fremgangsmaade: Fedt fixeres i Flemmings krom-osmium-eddikesyre (s. 84), udvaskes i vand, farves i safranin eller methylviolet og behandles nogle timer med ozoniseret terpentin (s. 172), der atter opløser fedtet. Ogsaa med vesuvin + 1/4 pct. osmiumsyre kan kjærnefarvning af friskt fedt erholdes. (Kjærnen flad, lige under cellens overflade i begge ender omgivet af et fint kornet protoplasma.

Fedtcellemembranen sees ikke hos den fedtfyldte celle; kommer tilsyne, naar fedtet extraheres ved abs. alkohol + æther, helst i varmeskab 37° C. Opvarmning med æther-alkohol maa ikke ske over fri flamme.

Fedtsyrekrystaller findes i gammelt fedt, gjerne saadant som i længere tid har været opbevaret i tynd alkohol.

Fedt under udvikling. Materiale: oment eller subkutant væv hos foetus (mennesket 5—6 md., kalvefostre 30—35 cm.).

Det slappe væv her behandles 12—24 timer i Flemmings vædske, udvaskes grundigt i vand, kan saa undersøges i glycerin eller hærdes i alkohol, farves og indleires i kanadabalsam. De nydannede fedtdraaber er sorte.

Uden hærdning kan det friske væv farves i en tynd opløsning af chinolinblaat (først opl. i abs. alkohol, dernæst fortyndet med vand, hvorefter udvaskes i vand). Straks efter farvningen sees væsentlig kjærnerne blaa, men efter 24 timer er fedtdraaberne mørkt blaa.

I kanadabalsampræparater vil fedtceller, der ikke er fixeret i Os., vise sig gjennemsigtige som huller i præparatet eller i større masser som et af cellemembranerne dannet nætværk, idet dels fedtet er extraheret ved behandlingen, dels unddrager sig iagttagelse, da det har samme brydningsevne som balsamen.

Brusk.

Hyalin brusk. Friske snit undersøges i saltvand. Den paa den maade lidt diffuse overgangslinie mellem brusksubstans

og perikondrium kommer skarpt frem ved farvning af alkoholhærdet brusk (snit) med hæmatoxylin (den hyaline, fuldt udviklede brusksubstans blaa, kjærner mørkeblaa) samt efterfarvning med eosin eller van Gieson. Safranin ½ ‰ farver brusk gul, bensubstans rød. Afvaskning i vand (om ønskes let eddikesyret).

Hensigtsmæssigt materiale: ribbensbrusk og trachealringe. Differensen i celleanordningen hos ganske ung, fuldt udviklet og gammel brusk sees godt i ribbensbrusk af forskjellige aldre.

Bruskens fibrillære anordning kommer frem ved flere ugers maceration i 10 pct. saltvand. Fiberstrukturen i gammelmandsbrusk eller asbestbrusk samt de senile kalkafsætninger undersøges paa snit af friskt eller hærdet materiale i saltvand eller glycerinvand.

Elastisk brusk, nætbrusk. Materiale: epiglottis ørebrusk, vanskelig at undersøge frisk. Hærdes i kromsyre 1 ‰ (god udvaskning) eller alkohol. Snit farves i hæmatoxylineosin (kanadabalsam). Sukcessiv farvning af kjærner med hæmatoxylin eller karmin samt af den elastiske substans med Taenzers orceïn (s. 139) eller Weigerts fuchsin-resorsin (s. 145).

Bindevævsbrusk, fiberbrusk. Materiale: den bløde, centrale del af discus intervertebralis hos større dyr. Kan undersøges frisk, pillet i saltvand. Fixeres og hærdes i alkohol, pikrinsyre (mættet vandig) eller Kleinenbergs vædske (s. 86). Skjæres, ikke for tyndt, uden indstøbning, kun klemt i gulerod. Den i alkohol indskrumpne fiberbrusk udbreder sig til bredere snit i vand. Kan farves i aniliner, hæmatoxylin, karmin.

Ben.

Bensubstansens almindelige anordning, Haverske kanaler, benlegemer med primitivkanaler undersøges bedst paa slebne benpræparater.

Friskt ben macereres gjennem flere maaneder i vand, tørres. Skiver paa ca. 1 mm. afsages og files nogenlunde jevne. Fæstes med en tyk gummiopløsning paa et stykke mat glas og slibes først paa den ene, saa paa den anden side med slibestene af stigende finhed. Naar benstykket er bleven gjennemsigtigt, bearbeides det med fin smergel mellem to glasplader, tilslut med fingeren paa den ikke smerglede glasplade. Udvaskes i vand, dernæst i æther-alkohol. Tørres. Kan undersøges tørt under dækglas. De luftfyldte benlegemer sees ved gjennemfaldende lys sorte paa lys grund.

Slebne benpræparater indlægges i kanadabalsam, idet en draabe af balsamen ophedes paa objektglasset, til opløsningsmidlet (xylol, terpentin o. s. v.) fordamper, og balsamen ved afkjøling blir stenhaard. Den ophedes nu paany til halvsmeltning, det færdige og ganske tørre slebne præparat trykkes ned i balsamen og dækkes med dækglas, hvorpaa det hele hurtigt afkjøles ved at lægges paa en kold glasplade. Idet den seigtflydende kanadabalsam hurtigt stivner, hindres den fra at trænge ind i og fylde benlegemerne og primitivkanalerne, som da viser sig sorte (luftfyldte) i det af balsamen opklarede, gjennemskinnende benvæv.

Farvning af benlegemer i slebne præparater.

Matschinskys sølvfarvning:

1. Præparatet udvaskes i vand.
2. Lægges 2 timer mørkt og 37° C. i 1 pct. nitr. arg. opl.
3. Optages, naar det brunes, vaskes, tørres, afpoleres paa overfladen, opbevares i mørke.

eller

Ruprechts fuchsinfarvning:

1. Ca. 0.3 mm. tykke, filede bensnit tørres, lægges nogle minuter i æther, tørres atter paa varmt glas og lægges for anden gang i æther.
2. Lægges ca. 5 min. fladt i kogende, mættet filtreret fuchsinopl., afkjøles.
3. Farven inddampes forsigtigt til tørhed.
4. Farven afskrabes af overfladen med kniv.
5. Snittet slibes mellem glasplader med pimpstenpulver og vævilinolje med benzin (1 : 10), dernæst paa en fin arkansassten med samme blanding.
6. Afvaskes i benzin.

7. Tørres og poleres i skrivpapir.
8. Indleires i kolophonium-benzin, objektglasset opvarmes.
Benlegemer med udløber er da stærkt røde.

Istedetfor slebne benpræparater kan man ogsaa til nød benytte smaa med kniv afskaarne spaan fra overfladen af et friskt rørben eller fine benfliser fra spongiosa. Disse smaa stykker opvarmes i vand et par timer, til fedtet opløses og flyder op, og henlægges derpaa i længere tid i æther + abs. alkohol, lige dele. Æther-alkoholen fjernes ved fordampning, hvorefter stykkerne lægges i kanadabalsam som beskrevet ovenfor for slibepræparater.

Benlegemer isoleres ved at behandle dekalcinerede tynde benplader (s. 92) med kalilud, til de let kan pilles eller rystes fra hverandre (Kölliker, Ranvier).

Haverske kanaler undersøges paa slibepræparater, eller paa snit af dekalcineret ben; saavel længdesnit som tværsnit. Kanalernes forløb markeres bedst paa snit af indstøbte celloidinpræparater, farvede kraftigt i methylenblaat, vesuvin, lithionkarmin o. s. v., da farvestoffene fæster sig mere i den kanalerne opfyldende celloidinmasse end i den dekalcinerede bensubstans.

Sharpeys fibre sees bedst i snit af kranialben af kylling, ydre grundlameller og intermediære lameller i rørben hos unge dyr, dekalcinerede i v. Ebners saltsyre-klornatrium (s. 93), undersøgt i glycerin. De farves, idet snit af dekalcineret ben først lægges i koncentreret eddikesyre, til de er gjennemsigtige, dernæst 1/4—1 time i koncentreret vandig opløsning af indigokarmin, undersøges i glycerin eller efter deshydrering og opklaring i kanadabalsam; de Sharpeyske fibre viser sig røde (Kölliker).

Periost. Rørben af fostere eller ganske unge (nyfødte) individer sages i smaa skiver, dekalcineres i 1 pct. kromsyreopl. (skiftes ofte), udvaskes grundigt i vand 24—48 timer, indstøbes i celloidin (s. 99), skjæres, farves i karmalun eller hæmalin (s. 124, 131), kontrafarve resp. pikrinsyre eller eosin. Kanadabalsam. Præparaterne viser ogsaa godt periosteale osteoblaster.

Benmarv.

Dækglaspræparater af rød benmarv.

Friske ryghvirvler eller ribben oversages, klemmes i skruestikke, saa marven tyter ud. En draabe smøres tyndt ud mellem to dækglas, som atter trækkes fra hverandre. Kan her enten undersøges direkte eller farves under dækglas med pikrokarmin (udvaskning med vand, undersøgelse i eddikesyre-glycerin s. 80).

Benmarven kan ogsaa fixeres og hærdes paa dækglas, idet dette efter at være besmurt med et tyndt lag benmarv straks

1. fixeres 10—15 min. i Heidenhains sublimat.,
2. udvaskes i rigeligt vand,
3. farves et par min. i tynd eosinopløsning,
4. udvaskes i vand,
5. kjærnefarves i hæmatoxylin,
6. vaskes, tørres og
7. deshydreres hurtigt i abs. alkohol, bergamotolje, kanadabalsam (Stöhr).

Røde blodlegemer og hæmatoblaster er rosa, andre celler graaviolet, eosinophile granulationer stærkt røde. Undersøgelsen af neutrophile og basophile cellegranulationer se under blod.

Snitpræparater af benmarv.

Rørben knuses i skruestikke, saa marven løsner, eller den udtages forsigtigt af kort afsagede stykker. Ønskes fedtceller særligt undersøgte, fixeres og hærdes i kromosmiumsyre eller Flemmings vædske (s. 84); i andet fald sker fixation i Müllers vædske (s. 89), sublimat (s. 85), Zenkers vædske (s. 88) eller formol (s. 87). Udvaskning, efterhærdning i alkohol, indstøbning (paraffin celloidin). Farvning i de almindelige kjærne- og protoplasmafarver (karmin, hæmatoxylin, safranin) i Ehrlichs eller Biondi-Heidenhains farveblandinger til differentiering af de forskjellige cellearter (s. 203).

Forbening. Materiale: ossifikationslinien i ribben eller epifyselinien i rørben hos fostere i 5te—8de maaned, for perichondral forbening diafysen. Forbening af bindevævsben: lacunar specielt tuber frontale eller tuber parietale.

Hærdning i Müllers vædske, alkohol.

Ved ældre ben med større kalkafsætning dekalcineres i 1 pct. kromsyre, god udvaskning i vand. Indleiring i celloidin. Snit farves i 1—2 pct. fuchsinopl. eller til bedre differentiering i karmin og derpaa i hæmatoxylin, efterfarves i pikrinsyre (kjærner røde, hyalin brusk blaa, bindevæv og blod gult); ogsaa i hæmatoxylin-safranin. Foetale kranialben farves meget instruktivt i karmin (kraftigt) med efterfarvning i indigokarminpikrin (s. 156) eller i hæmatoxylin med van Giesons efterfarvning (s. 155). I kraniebenene sees ogsaa osteoblasterne meget godt. Undersøges i kanadabalsam.

Tænder.

Slibepræparater af tænder til oversigt som benpræparater (s. 198).

Weils tandslibning med bibeholdelse af bløddelene.

1. Friske tænder kløves med skarp løvsag nedenfor halsen.
2. Fixeres i sublimat 5 pct. flere timer.
3. Udvaskes i vand $^1/_2$—1 time.
4. Hærdes i stigende alkoholer med 2 pct. iodtinktur til udvaskning af sublimaten. Eftervaskes i ren alkohol til absolut hvidhed.
5. Farves 2—3 dage i alkoholisk boraxkarmin.
6. Differentieres 2—3 dage i saltsyrealkohol (1 pct.).
7. Deshydreres hurtigt i abs. alkohol ca. $^1/_2$ time.
8. Ætherisk olje 12—24 timer.
9. Xylol, derpaa rigelig kloroform.
10. Kloroform — kanadabalsam 24 timer.
11. Inddampes til glashaardhed.
12. Den hele masse med tanden sages i skiver under vand, slibes som ben præparat, undersøges i kanadabalsam.

White impregnerer tænderne med stærk fuchsinfarvet kollodium før slibningen (tandkanaler røde).

Dekalcinering af tænder i 2—5 pct. salpetersyre, Hougs salpetersyre-phoroglucin eller krompikrinsyre.

Tandrør isoleres, idet smaa stykker af tænder 10—12 timer macereres i koncentr. saltsyre eller salpetersyre og derpaa rystes.

Tanddannelsen (udviklingen). Kjæver, bedst underkjæve, af foster eller nyfødte individer hærdes i alkohol eller Müllers vædske. Klippes i stykker paa 1—2 cm. længde, dekalcineres i kromsyre 2 pct. eller pikrinsyre (s. 94), udvaskes godt i 24 timer. Indstøbes nøiagtigt i celloidin. Snit farves i hæmatoxylin-eosin.

Blod.

Friskt blod, udtømt ved et stik med ren naal af den let sammentrykte ørelap eller fingerspids og uden videre be-

handling kun dækket af dækglas, viser bedst pengerulleanordningen af de røde blodlegemer. Den store masse af disse og præparatets forgjængelighed tillader dog ingen nøiere undersøgelse af de enkelte blodlegemer. Præparatet hindres fra udtørren og holder sig bedre, naar det straks omgives med voksrand (s. 174). Blodmassen maa ikke være for tyk, men dækglasset maa heller ikke trykke; en ganske tynd voksfod under samme er ofte hensigtsmæssig.

Vil man nøiere undersøge blodet i flydende tilstand, opfanges den udtrædende bloddraabe i nogle draaber Pacinis eller Hayems vædske (s. 86) enten direkte paa objektglasset eller i en liden skaal. Det blir da samtidig fixeret og fortyndet; 3 pct. sulphat. natr. eller fysiologisk saltvand (0.6—0.75 pct.) kan ogsaa benyttes.

(Det er ikke altid let at faa øie paa de hvide blodlegemer; de blir lettere at finde, naar man, efter først at have indstillet paa et paa bunden af præparatet liggende rødt blodlegeme, gradvis skruer mikroskopet op (indstiller paa høiere liggende lag); levkocyterne vil da paa grund af sin kugleform og deraf følgende lyskoncentrerende evne falde i øinene som lyse, klare smaa legemer.)

Kjærneholdige røde blodlegemer undersøges bedst i blod fra fiske eller frosk. Kjærnerne kan farves samtidig med fixation i Toisons vædske:

Methylviolet 5 B .	0.25
Klornatrium . . .	1.00
Sulphat. natr. . . .	8.00
Glycerin (syrefri) .	30.00
Vand	160.00

Farvningen er brugbar efter 10 min., stærkest efter 20—30 min.

Ogsaa kjærnerne i levkocyterne kommer tydeligere ved Toisons farvning, vædsken egner sig derfor ogsaa ved tælling af hvide blodlegemer.

Blodpladerne er yderst ømfindtlige legemer, som ødelægges og lægger sig sammen i hobe, saasnart de udsættes for luften eller kommer udenfor karret. De maa derfor opfanges i et fixerende medium. Huden vaskes omhyggeligt med ætheralkohol (hos dyr efter forudgaaende barbering), en draabe 1 pct.

osmiumsyre, methylviolet i fysiologisk saltvand (0.01—50.00) filtreret eller ogsaa i

Dahlia-Glycerin } ana.
Saltvand 2 pct. }

dryppes derpaa, og gjennem draaben gjøres nu indstikket i huden, saa det udtrædende blod straks blandes med reagenset.

Den blandede draabe opfanges paa et dækglas, undersøges med stærk forstørrelse.

For mere indgaaende undersøgelser af blodets korpuskulære elementer anvendes de af Ehrlich indførte tørre dækglaspræparater med forskjellige farvemethoder. Fornemmelig er disse methoder nødvendige ved undersøgelser over de forskjellige levkocytformer.

Til disse tørre blodpræparater anvendes feilfrie, ikke for sprøde dækglas af 0.08—0.1 mm. tykkelse. De renses før brugen ved 30 min. ophold i æther (glassene maa ikke ligge ovenpaa hverandre), forsigtig aftørren med blødt linlærred, ny afvaskning nogle minuter i abs. alkohol med efterfølgende tørring. Opbevares i lukkede glasdaaser.

Dækglassene maa, naar de skal bruges, ikke udsættes for den fra fingrene udstrømmende fugtighed, maa derfor holdes med pincetter. Den fra stiksaaret udflydende bloddraabe (ikke for stor) berøres med det ene dækglas, som derefter lægges paa det andet, saa blodet kapillært udbreder sig mellem dem. Dækglassene trækkes forsigtigt fra hverandre uden tryk, saa belægget paa dem begge blir saa jevnt som muligt. Tørres i luften i løbet af 10—30 sekunder. (Fugtige uddunstninger, endogsaa aandedræt af omstaaende personer maa undgaaes).

Det tørrede præparat fixeres enten ved tør varme eller ved kemisk indvirkning. Den kraftigste fixation udkræves, hvor farvningen senere bevirkes af sure eller alkaliske blandinger.

Fixering ved tør varme bevirkes ved, at de færdige dækglaspræparater lægges paa den ene ende af en langstrakt kobberplade, medens den anden ende holdes opvarmet ved en flamme. Ved at dryppe vand, toluol eller xylol paa pladen findes let de steder, der svarer til disse stoffes kogepnnkt (resp. 100, 111, 140° C.). Let fixation opnaaes i ½—2 min. i ca. 110° C., intensere fixation kræver høiere temperatur eller op til flere timers varighed.

Fixering ad kemisk vei foretages med æther-alkohol et par timer, absolut alkohol nogle minuter, kogning 1 min. i abs. alkohol eller i 1 pct. alkoholisk formolopløsning 1 min.

Til almindelige oversigtspræparater af blodet kan ogsaa bruges de almindelige midler: Flemmings vædske, sublimat o. s. v.

Farvningerne har dels til hensigt i sin almindelighed at differentiere mellem kjærner og protoplasma, dels specielt de i levkocyternes protoplasma indeholdte forskjellige granula (se forøvrigt s. 119).

Kjærnefarvning af blod i dækglaspræparater.

Det færdige dækglaspræparat (se ovenfor) fixeres et par minuter tørt i ca. 110° C., eller ½—2 timer i abs. alkohol.

Farves ½—2 timer i:

Eosin (eller orange G) . . .	0.50
Hæmatoxylin	2.00
Absolut alkohol	.
Aqua dest.	.
Glycerini . . . . . ana	100.00
Acid. acet. glac.	10.00

(farven vel modnet i flere uger).

Afvaskes grundigt i vand.

Kjærner hæmatoxylinblaa, hæmoglobin og acidophile granulationer røde.

Lymphocyter med sine basophile (δ)-granulationer kan farves i let fixerede præparater ca. 10 min. i de vanlige basiske farvestoffe methylenblaat, fuchsin, methylviolet, bismarkbrunt. Ehrlich anbefaler særligt Chenzinskys farveblanding:

Vandig koncentr. methylenblaatopl.	80
½ pct. eosinopl. i 70 pct. alkohol	20
Vand	40

friskt filtreret. Farver i 6—24 timer i lufttæt lukket glas 37° C.

Mastceller, basophile (γ)-granulationer farves ogsaa godt i ovennævnte Chenzinskys opløsning, samt i Dahlia (s. 144) og i thionin (s. 153) metakromatisk.

For neutrophile (ε)-granulationer i de polynucleære levkocyter, samt ogsaa for oversigtspræparater anvendes de s. 156—157 angivne trefarveopløsninger. Ehrlich har nylig (1898) angivet en ny modifikation heraf:

Mættet vandig orange-G opl. .	13—14
» » syrefuchsinopl.	6—7
Aqva dest. . . . . , ...	15
Alkohol	15
Mættet vandig methylgrønt opl.	12.5
Alkohol	10
Glycerin	10

hældes sammen i nævnte rækkefølge; naar methylgrønt opl. er kommet til, rystes grundigt. Præparatet behøver kun ubetydelig fixation, farves i 5 min. Kjærnerne grønne, røde blodlegemer orange, neutrophile granulationer violette, acidophile kobberfarvede.

Acidophile s. eosinophile (α)-granulationer farves i hæmatoxylin-eosin (se under kjærnefarvning i blodpræparater (s. 204), i eosin alene , eller i Ehrlichs, Biondi-Heidenhains og v. Kahldens trefarveblandinger (s. 156—157).

Fibrintraade i koaguleret blod farves efter Weigerts iod-methyl-violet-methode (s. 147).

Hæminkrystaller, Teichmanns blodkrystaller.
(Paavisning af blod).

Smaa dele af det antagelig blodflekkede stof (papir, tøi, træ o. s. v.) udludes paa et objektglas i lidt fysiologisk saltvand (0.6—0.75 pct.) og udpresses deri godt. Vædsken indtørres forsigtig over en flamme, det tilbageblivende belæg skrabes sammen i en liden haug og tilsættes 1 draabe iseddike, dækkes med dækglas og opvarmes paany, til blæredannelse begynder; opvarmningen fortsættes da, til alt er indtørret. De mørkt brune langstrakte rhombiske hæminkrystaller findes talrigst ud mod periferien.

Nervesystemet.

Centralnervesystemet.

Oversigtspræparater af hjerne, lille hjerne eller rygmarv fremstilles ved at hærde i Müllers vædske (s. 90) 6—8 dage; mængden af vædsken, der flere gange maa skiftes, bør være 50 gange saa stor som objektets volum; skal den hele hjerne fixeres og hærdes, maa hærdningsvædsken ogsaa injiceres gjennem carotiderne, som først udskylles med saltvand. Efter hærdningen udvaskes godt i vand, efterhærdes i alkohol i mørkt rum. Indstøbning i celloidin, snitfarvning i nigrosin 0.5 pct., hvorved væsentlig ganglieceller og aksecylindre farves, eller farvning i karminsur natron (s. 127) eller i Walters hæmatoxylin (s. 135)

De prævertebrale ganglier og ganglion Gasseri (de sidste er lettere at udpræparere) hærdes ligeledes i Müllers vædske, udvaskes, efterhærdes i alkohol, indstøbes i

celloidin. Snit farves i hæmatoxylin-eosin eller i karmin-pikrinsyre. Gangliecellerne farves her i det hele svagt.

Ganglieceller isoleres ved at macerere ganske smaa stykker (grynstore) af corticalis cerebri eller rygmarvens graa substans fra et nys dræbt dyr i 0.1 pct. osmiumsyre 8—10 dage og forsigtig pille stykkerne fra hinanden.

Ganglieceller i centralorganerne undersøges efter Nissls methylenblaat-methode (s. 152) paa alkoholhærdede præparater.

Foruden farvning i methylenblaat angiver Nissl ogsaa følgende fuchsinfarvning for ganglieceller:

1. Hærdning i stigende alkoholer, smaa stykker.
2. Indstøbning.
3. Snit farves i vandig koncentr. fuchsinopl. under opvarmning, til vædsken damper.
4. Udvaskes i abs. alkohol et par minuter.
5. Differentieres og opklares i nellikolje, til farveskyerne ophører. Kanadabalsam.

Kultschitzkys og Wolters hæmatoxylinfarvninger se s. 135.

De smukkeste billeder af centralorganernes ganglieceller leverer dog Golgis kromsølvfarvning (s. 161) og Ehrlichs vitale methylenblaafarvning (s. 150). Et rigtigt begreb om gangliecellernes virkelige udseende faar man dog først ved sammenligning af de forskjellige methoders resultater.

Centralnervesystemets marvholdige fibre (fiberretninger) se Weigerts eller Pals marvskedefarvning (s. 133—134); kan forbindes med kontrafarvning med karmin, vesuvin, eosin, hvorved cellerne træder bedre frem.

Kultscitzkys hæmatoxylin s. 135.

Ogsaa snit af Müller-hærdet hjerne farvet i Sahlis methylenblaat (s. 150) 1/4—2—3 timer og differentieret i vand eller alkohol gir smukke billeder. Indleires i kanadabalsam.

Aksecylindre i centralnervesystemet farves paa friske objekter med Ehrlichs vitale methylenblaat (s. 150). Efter hærdning i Müllers vædske kommer aksecylindrene godt frem ved farvning af snit i 0.5 pct. nigrosin (nogle faa minuter), i Sahlis methylenblaat (s. 150), Freunds guldklorid (s. 170).

Nevroglia.

Nevrogliaceller farves ved Golgis kromsølvmethode (kortere, 2—3 dages, indvirkning af kromsaltopløsningen).

Nevrogliafibrene blir meget skarpt fremhævede ved Weigerts nevrogliamethode (s. 148). Kan ogsaa farves med Walters hæmatoxylin (s. 135) eller Mallorys hæmatoxylin-fosformolybdensyre.

1. Snit farves fra 20 min. til 1 time i en nyfiltreret, flere uger for sollyset udsat opløsning af

Fosfor-molybdensyre, 10 pct opl. .	10.00
Hæmatoxylin	1.75
Vand	200.00
Karbolsyre	5.00

2. Udvaskes 5—20 min. i 50 pct. alkohol, vædsken skiftes 2—3 gange.
3. Deshydreres, indleires i kanabalsam. (v. Kahlden).

Perifere nerver.

Cerebrospinale.

Tværsnit af hele nerver til oversigt. Frisk nerve udtages — ischiadicus hos kaniner og lignende mindre dyr — fæstes med traad til en træpind (fyrstik), lægges hermed til fixering og hærdning i Müllers vædske, Formol-Müller; udvaskes, alkoholhærdes; stykker af den saaledes retliniet hærdede nerve indstøbes; snit farves i karmin-pikrinsyre, hæmatoxylin-eosin eller van Giesons hæmatoxylin.

Friske nervefibriller udtages hurtigt af et nylig dræbt dyr, pilles i saltvand omhyggeligt og forsigtig, saa fibrene holder sig strakte og ikke krølles op, undersøges i saltvand. De forskjellige former af myelindraaber iagttages samtidig.

Man ser myelinen, som gradvis emulsioneres med det i nerven indtrængende saltvand danne fine draaber inden Schwanns skede, desuden Ranviers og Schmidt-Lantermanns indsnøringer tildels ogsaa nevrilemkjærner i profil.

Ranviers og Schmidt-Lantermanns indsnøringer kommer tydeligere frem, naar friske nerver hurtig udpilles i 0.1 pct. osmiumsyre (med glas- eller trænaale, ikke metal) og forbliver der ca. 15 min., udvaskes i vand, undersøges i glycerin.

Tværlinierne i Ranviers indsnøringer (kitlinien mellem to sammenstødende segmenter af nevrilemmet) udhæves tydeligt, naar ganske friske, endnu varme nerver pilles glat ud paa halvtørt objektglas, behandles med 0.5 pct. salpetersur sølvopl. paa objektglasset ca. 30 min. i mørke, udvaskes godt i vand, undersøges i glycerin, eller (efter deshydrering og opklaring) i kanadabalsam. Tværlinierne er da sorte, ligeledes sværtes de nærmest samme værende partier af aksecylinderen, saa den fremkomne figur blir det saakaldte Ranviers kors.

Som alle sølvpræparater blir ogsaa disse gjerne mørkere ved nogen tids henliggen.

Nevrilemmets kjærner. Nervefibriller udbredt paa objektglas ved halvtør pillen farves i hæmatoxylin, pikrokarmin eller methylenblaat, udvaskes, tørres, undersøges i kanadabalsam.

Sympathiske nervefibre.

Materiale: nervus vagus eller sympathicus.

Pilles friskt, undersøges i saltvand. Nervus vagus kan ogsaa pilles ca. 10—15 min. i 0.5 pct. osmiumsyre, udvaskes godt i vand, farves i hæmatoxylin, undersøges i glycerin. De cerebrospinale fibre er da osmiumsyresværtede, de sympathiske tynde ufarvede med svagt blaafarvede kjærner.

Sympathiske nervenæt (kfr. Auerbachs plexus med guldklorid s. 169), farves ogsaa godt i galdeblæren ved Ehrlichs farvning med methylenblaat (s. 150).

Nerveender.

Motoriske nerveender i tværstribede muskler. For lettere at finde nerven benytter man helst korte muskler f. eks. intercostalmuskler. To ribben med mellemliggende muskel udtages af det netop dræbte dyr i et par cm.^{2} udstrækning, eller om ønskes mere; man kan endog med en gang bearbeide den ene halvdel af mindre dyrs brystkasse paa en gang. Spændes stramt med serosasiden fri med træpinde paa en korkplade og behandles med guldklorid efter de s. 169 angivne methoder.

Opbevares i glycerin. Gode præparater er kraftigt brunrøde. Ved undersøgelsen udklippes et lidet stykke af muskulaturen, saa at fibrene faaes med i sin hele længde, de bredes forsigtig fra hinanden uden helt at isoleres for ikke at overrive nerverne, hvorpaa den sidste isolering kan foretages ved et let lidet tryk med naalen paa dækglasset.

Sensitive nerveender.

Frie nerveender. Guldfarvning (s. 169) af frisk cornea, hærdning i alkohol, fine snit lodret paa overfladen.

Merkelske føleceller. Guldfarvning af smaa stykker svinetryne, hud i planta; hærdning, snit lodret paa overfladen.

Grandrys legemer. Den bløde hud paa roden af næbbet hos ænder og gjæs afklippes i tynde strimler, lægges i 1 pct. osmiumsyre ca. 24 timer mørkt, udvaskes i vand, hærdes i alkohol. Skjæres.

Meissners endelegemer i hudpapillerne. Afklippede tynde stykker af epidermis med underliggende papillærlag fra yderste leds overflade paa en frisk amputeret finger eller taa farves i guldklorid (s. 169), hærdes i alkohol, tynde snit. Ogsaa Erlichs methylenblaat-methode (s. 150) giver vakre resultater, især fine billeder af nervefordelingen om endelegemet.

Vater-Pacinis legemer findes i fedtet lige under huden i fodsaalen hos mennesket som op til 1 mm. store ovale graalige gryn. I rigeligt antal findes de i kattens mesenterium. Undersøges friske i saltvand, efterat fedtet forsigtigt er bortpillet. Ved tilsætning af glycerin skrumper de. Nerven farves sort ved tilsætning af lidt 1 pct. osmiumsyre.

Golgis muskelspoler faaes bedst frem ved behandling med Ranviers guldkloridmethode (s. 169).

Muskler.

Glatte muskelceller. — Isolerede smaa stykker uterus- eller tarmmuskulatur afklippes, isoleres ved maceration i 35 pct. kalilud ca. 1/2 time, 30 pct. salpetersyre 2—3 dage, 1 pct. formol 8—14 dage, Hayems vædske flere uger, og rystes eller pilles fra hverandre.

Glat muskelvæv. Til oversigtssnit tages alkoholhærdet uterinmuskulatur, der indstøbt eller uindstøbt skjæres, farves med hæmatoxylin-eosin (v. Gieson), pikrokarmin, vesuvin o. l.

Til finere undersøgelser anbefaler Werner:

1. Fixering 8—12 timer (grovere sager 24—48 timer) i Flemmings vædske (s. 84).
2. Afvaskes i rindende vand.
3. Farvning i Heidenhains hæmatoxylin eller Golgi-farvning.

Cellebroer i de glatte muskler. Længdemuskler af en oksecolon fixeres i 4 pct. formol, indstøbes i paraffin (s. 107); de tynde snit farves i hæmatoxylin-eosin.

Efter Bahermann fixeres bedst i Heidenhains sublimat (s. 88) og farves med Golgis kromsølv (s. 161 flg.). Fine snit.

Tværstribede muskelfibre.

Friske muskelfibre udklippes langs efter muskelen hos et nys slagtet dyr; pilles forsigtigt og nøiagtigt og undersøges i saltvand. Intet tryk paa dækglasset! De mørke og lyse, tværstriber sees tydeligt, desuden ogsaa mere uregelmæssige tværlinier efter muskelkontraktionen. Sarkolemmet kan sees

hvor naalen under udpillingen har trykket det kontraktile protoplasma sammen eller vredet fiberen om sig selv.

Ved tilsætning af 2 pct. eddikesyre under dækglasset (s. 80) kommer kjærnerne stærkere frem.

Til undersøgelse af finere detaljer i de tværstribede muskler egner sig bedst krebsdyr og insekter, specielt vandkalven (dytiscus). Insektet dræbes med nafta, et ben rykkes ud, og de ved stumpen hængende muskelfibre strækkes i længden ved at trækkes henover et tørt objektglas. De skjæres hurtigt af benet, kan nu dækkes med en draabe saltvand og dækglas til undersøgelse. Immersionslinse.

Bowmans discs. Frisk tværstribet muskel lægges 24 timer i

Saltsyre 1 prm } lige dele.
Eddikesyre 1 pct. }

Derefter 3—4 dage i

Eddikesyre 1 pct. . 2 dele.
Glycerin . . . . . 1 del.

De opløses da fra hverandre efter tværstribningen. Ogsaa saltsyre eller eddikesyre alene i den angivne styrke viser godt de Bowmanske discs efter 1—2 dages indvirkning. Ved den almindelige Löwitz guldkloridfarvning (s. 169) kommer ogsaa musklernes tværstribning som skiverne godt frem.

Muskelfibrillerne. Længdestribningen kommer godt frem efter maceration i Ranviers alkohol (s. 76); i pillepræparater kan de enkelte fibriller isoleres. Farves i pikrokarmin.

Til hærdning af muskler er Flemmings vædske (s. 84) eller Marchis osmium-Müller-vædske (s. 172) bedst egnet. Ogsaa alkohol. Smaa muskler, f. eks. sartorius af frosk, eller mindre muskelbundter udstrækkes og bindes i begge ender til en liden glas- eller træstav og fixeres saaledes. Passende stykker heraf indstøbes (s. 99, 101) og skjæres, saavel længdesnit som tværsnit, og farves i hæmatoxylin van Gieson (blaa kjærner, gule muskelfibre, rødt bindevæv), hæmatoxylin-eosin eller karminpikrinsyre (indigokarmin).

Muskelfibrenes sammenhæng med senen. Stykker af en semimembranosus (et par mm.) paa overgang til senen macereres $^1/_2$—1 time i 40 pct. kalilud, undersøges deri. De spidse eller koniske ender af muskelfibrene løsnes ved forsigtig pillen.

Hjertemuskler.

Enkelte muskelceller isoleres ved maanedlang macereren i Hayems vædske (s. 86) eller 40 pct. kalilud i ca. ½ time.

Hærdning i alkohol, Müllers (s. 89) eller Flemmings (s. 84) vædske. Snitpræparater farves i karmin eller hæmatoxylin.

Kar.

Kapillærkar. Et stykke af hjernens tynde hinder med de ind i hjernesubstansen gaaende fine kar fjernes med pincet, rystes omhyggeligt i vand, macereres 12—24 timer i vand. De fineste frynser afklippes og enten undersøges direkte i saltvand, eller lægges 1 time i alkohol, farves i hæmatoxylin, indleires i kanadabalsam.

Kapillærnet. Friskt svine(okse-)øie afskjæres lige bag ora serrata, glaslegemet udpresses forsigtigt. Den bagerste del med den ved papillen fasthængende retina macereres 24—36 timer i rindende vand; retina afklippes og rystes i et reagensglas halvfuldt med vand; fine florformige partier undersøges i saltvand eller hærdes i alkohol et par timer, farves i hæmatoxylin.

Endothelet i intima. Kitlinierne mellem cellerne fremstilles ved impregnation af omentet med salpetersurt sølv (s. 160). Ved rigtig indstilling vil man her i mange af de smaa kar finde karendothelet sølvimpregneret.

Arterier og vener. Kar hærdes i alkohol, formol, Müllers vædske osv. Indstøbes. Snit farves med de almindelige kjærnefarvningsmidler (hæmatoxylin, karmin, vesuvin) og kontrafarve (eosin, pikrinsyre, van Giesons farve).

Karrenes elastiske fibre og membraner træder frem som lyse striber og ringe i snit i glycerin. Isoleres ved 2 pct. kalilud. Farves i snit ved Taenzers orceïn (s. 140)

hvortil kan anvendes kjærnefarvning med karmin eller Weigerts fuchsin-jernklorid (s. 145) med kjærnefarvning med hæmatoxylin og kontrafarvning med van Gieson (ɔ: sortviolette elastiske fibre, blaa kjærner, brune muskelfibre, rødt bindevæv).

De elastiske (fenestrerede) membraner i aorta isoleres ved at macerere smaastykker af karvæggen i flere uger eller mere i Hayems vædske, hvorefter de enkelte lag flaaes forsigtig af med en fin pincet.

Karnerver (vasomotoriske). Lungen udtages hurtigt af et netop dræbt dyr, injiceres med Ehrlichs methylenblaat (s. 150), tynde stykker udklippes med saks eller skjæres, fixeres i pikrinsur ammoniak eller Bethes fixationsmittel (s. 151).

Lymfekar (kapillære). Injektion med en Pravaz-sprøite af ricinusolje 2 dele + abs. alk. 1 del; efterfølgende udvaskning med vand, fixering og farvning med 1 pct. osmiumsyre. Injektion paa samme maade med berlinerblaat (s. 185). Sprøitespidsen føres direkte ind i vævet, og vædsken fordeles ved let gnidning. Se forøvrigt s. 185.

Itler, lymfeknuder. Oversigtspræparater: Af friske itler fra lysken, akselhulen eller krøset afskjæres begge pole. Det tilbageblivende midtbelte med hilus fixeres og hærdes i Müllers vædske (s. 89), udvaskes i vand. Fine frysesnit (eller efter hærdning i alkohol) skaarne uden indstøbning i celloidin eller paraffin, udpensles (s. 78) omhyggeligt eller rystes grundigt i vand. Farves i hæmatoxylin-eosin.

Itlernes reticulære bindevæv undersøges som s. 195 angivet.

Milt. De enkelte celleelementer isoleres ved at udskrabe lidt miltpulpa fra en frisk snitflade og undersøge i saltvand (halvmaaneformede karendotheler, blodlegemer, smaa og store levkocyter). Til nøiere undersøgelse af de forskjellige cellearter gjør man dækglaspræparater med fixering og farvning efter Ehrlich (s. 203).

Kjærnedelingspræparater se s. 189.

Oversigtspræparater faaes bedst af okse-, kat- eller kaninmilt. Hærdes i Müllers vædske (s. 89) eller alkohol (s. 91), indstøbes i celloidin (s. 99), tynde snit farves i hæmatoxylin

og van Gieson (s. 130—139). Menneskemilt viser specielt mindre tydeligt trabekler og follikler.

Det reticulære net fremstilles som s. 195 angivet.

Thymus. Smaa stykker hærdes i Müllers vædske eller alkohol (s. 89—91), indleires i celloidin eller paraffin, tynde snit farves i hæmatoxylin-eosin (s. 130).

Huden.

For at faa et overblik over hudens bygning bør man vælge materiale fra forskjellige steder af legemet (planta viser bedst epidermislagene og svedkjærtler, næsevinge talgkjærtler, ryghud har talrige elastiske fibre, øienlaaget repræsenterer en meget fin og tynd hud).

Oversigtspræparater: Smaa hudstykker (for at hindre hudstykkerne i at rulle sig op i hærdningsvædsken fæstes de gjerne paa en korkplade med epidermis mod korken) hærdes i Müllers formol (s. 89), alkohol (s. 86), sublimat (s. 85),, indstøbes i celloidin, snit farves i hæmatoxylin-eosin (s. 138), hæmatoxylin-van Gieson (s. 139), karmin-pikrinsyre (s. 127) eller ogsaa vesuvin (s. 143), undersøges i glycerin og i kanadabalsam (s. 175). Snit af huden i planta og vola bør lægges tværs paa papillerækkerne.

De fleste detaljer sees paa planta- og volasnit, da huden her er tykkest.

Ordningen af papillerne sees bedst paa snit parallele med overfladen i de dybe epidermislag paa en fingerspids.

Huden farves med Taenzers orceïn (s. 140), Weigerts fuchsin-jernklorid (s. 145) eller Herxheimers hæmatoxylin-jernklorid (s. 137).

Hudens elastiske fibre: Smaa, ganske friske stykker behandles efter Martinottis kromsølvmethode (s. 166), orceïn (s. 140), Weigerts fuchsin (s. 145).

Hudkarrene. En større hudlap med underliggende fedtlag afpræpareres, arterien opsøges og injiceres (s. 180) med en

fin sprøite. Naar korion skinner stærkt farvet gjennem epidermis, klippes den i smaa stykker, hærdes, indstøbes og skjæres. Kjærnefarvning kan foretages, om ønskes.

Hudnerverne farves efter en af guldmethoderne (s. 168) eller med Ehrlichs vitale methylenblaat (s. 150).

Haar. Et enkelt hovedhaar eller bedre skjæghaar udrives, undersøges i saltvand (iagttag rodskeden, cuticula).

Haarets celleelementer isoleres ved at opvarme et haar under dækglas i 2 pct. kali (bør ikke koge), let tryk paa dækglasset isolerer cellerne. For kali kan ogsaa bruges stærk svovlsyre.

Tværsnit af haar. Deshydreres i alkohol, indstøbes i haard paraffin (s. 101), ordnes parallelt under indstøbningen, skjæres tværs paa længderetningen.

Haarbælgen. Behaaret hovedhud eller skjæghud hærdes i alkohol (s. 91) eller Müllers vædske (s. 89), indstøbes og skjæres saavel langs haarene som paa andre hudstykker tværs paa dem. Stykket maa indstilles med særligt hensyn til haarenes skraa stilling i huden.

Farves i borax-karmin — pikro-indigokarmin (s. 128) (røde kjærner, gul hornsubstans, blaat bindevæv) eller med hæmatoxylin van Gieson (s. 138) (blaa kjærner, gul hornsubstans, rødt bindevæv). Selvfølgelig kan ogsaa enklere kjærnefarvning alene med hæmatoxylin, karmin, vesuvin benyttes.

Negl. Negleled af børn hærdes i Müllers formol eller i alkohol. Dekalcineres i Hougs salpetersyre-alkohol (s. 94) og hærdes paa ny i alkohol, indstøbes, skjæres (langs eller tværs fingerens akse). Farves i boraxkarmin-pikrinsyre, hæmatoxylin-eosin (s. 39); kanadabalsam.

Mundhulen.

Slimhinden i mundhulen afløses fra muskulaturen, hærdes i alkohol (s. 91) eller Müller-formol (s. 88). Indstøbes.

Snit farves i hæmatoxylin-eosin eller andre kjærnefarvninger med efterfarvning. Ønskes slimkjærtlerne udhævede, kan de efter kjærnefarvning med hæmatoxylin farves røde med Mayers mucikarmin (s. 127). Efter kjærnefarvning med karminer eller cochenille (s. 124 flg.) kan slimfarvningen foretages med toluidinblaat eller thionin (s. 153).

Tungeslimhinde afpræpareres i ca. 4—5 mm. tykkelse fra den underliggende muskulatur. Alkoholhærdning, farvning med karmin-pikrinsyre osv. Slimhinden bør være saa frisk som mulig, da ellers papillæ filiformes let taber sit epithel ved forraadnelse. Papillerne kommer bedst frem paa sagittale snit af rovdyrtunger (kat); muskulaturens ordning sees bedst paa tværsnit af kanin- og kattetunge.

Papillæ circumvallatæ udskjæres forsigtigt af slimhinden, passelig dybt, saa hele papillen kommer med, fixeres og hærdes, indstøbes, skjæres og farves som for slimhinden anført. Meget tynde snit for smagsløgene. Nerveforløbet til smagsløgene fremstilles ved guldklorid (s. 169), hærdning i alkohol, skjæres, kanadabalsam.

Farves snit af papillæ circumvallatæ i Sanfelices iodhæmatoxylin og udvaskes i eddikesur kali (s. 132), kan man finde ganglieceller ved roden af papillen graaligt farvet, epithelet himmelblaat.

Øsofagus af menneske eller mindre dyr. Bør undersøges i den øverste og i den nederste del, begge steder saavel længdesnit som tværsnit (muskelretning). Overgangsstedet til ventrikelen undersøges paa snit, som fra oesofagus i dennes længderetning gaar ind ventrikelen. Behandling som mundslimhinden. Kjærnefarvning med hæmatoxylin, efterfarvning med van Gieson giver smukke billeder.

Ventrikel.

Ventrikel af menneske er meget vanskelig at erholde frisk til histologisk undersøgelse, da slimhinden efter døden hurtigt

angribes af fordøielsessafterne og forandres. For at faa gode præparater af menneskeventrikel maa denne fixeres saa snart som muligt efter døden, bedst ved injektion tværs gjennem cardia med en alkoholisk sublimatopløsning 2,5 pct.

Af ventrikelslimhinder fra dyr egner kaninventrikel sig godt til oversigtspræparat (smukke parallele tubuløse kjærtler), hundeventrikel til undersøgelse af kjærtelcellerne (belæg- og dækceller).

Ventriklen udtages hurtigt af dyret, aabnes langsefter, indholdet udtømmes, og slimhinden afskylles hurtigt og forsigtigt med saltvand for at tjerne slim og spiserester. Stykker, høist et par cm. i kvadrat, udskjæres, idet man undgaar at berøre slimhinden forøvrigt med fingre eller instrumenter. Hvis undersøgelsen udelukkende er rettet mod slimhinden, bør denne forsigtig afpræpareres fra underlaget, da den senere behandling (indstøbning og skjæring) da er lettere. Stykket, enten den ene ventrikelvæg eller slimhinden alene, strammes og fæstes paa en korkplade med den frie slimhinde opad og kan, alt efter den behandling (farvning), som senere paatænkes, fixeres og hærdes, sublimat, Müllers vædske, Müllers formol, 1 pct. kromsyre eller alkohol. Skal særlig slimcellerne undersøges, er Müllers vædske at foretrække.

Indstøbes i celloidin (s. 99) eller paraffin (s. 101), Ved undersøgelse af den hele ventrikelvæg bør indstøbningen gjøres meget omhyggeligt — grundig deshydrering, langt ophold i celloidin —, da slimhinden ellers let løsner fra muskellaget, og paraffin og celloidin i det hele meget vanskeligt trænger ind i muskulaturen. Snittene maa som regel være meget tynde for at kunne vise de forskjellige celleformer.

Isolerede ventrikelceller. Maceration af smaa stykker frisk ventrikelslimhinde 12—24 timer i Ranviers alkohol eller 10 pct. klornatriumopløsning (s. 76). Med en pincet bevæges stykket forsigtig mod overfladen af et objektglas, hvorved de isolerede celler løsnes, undersøges i macerationsvædsken.

Oversigtspræparater af ventrikel.

Snit parallelt med kjærtlerne af kaninventrikel, hærdet i alkohol, indstøbt i celloidin, farves i vesuvin, hæmatoxylin eller karmin. Kanadabalsam.

Hoved- og belægceller i funduskjærtler differentieres godt ved Heidenhains kjærtelfarvning med hæmatoxylin-kromsyre (s. 133).

Paa snit parallele med slimhindens overflade viser funduskjærtlernes forskjellige celler sig meget skarpt; hvor snitretningen har været tidt skraa, kan man i samme præparat faa billeder fra alle slimhindens lag.

Møller anbefaler følgende:

1. Fine snit kjærnefarves $^1/_2$—$^3/_4$ time i Delafields hæmatoxylin.
2. Udvaskes 12—24 timer i vand.
3. Farves $^1/_2$—$^3/_4$ minut i van Gieson.
4. Udvaskes hurtigt i vand (om fornødiges tilsat lidt van Giesons farve for at undgaa for stærk udvaskning).
5. Deshydreres i abs. alkohol (tilsat v. Giesons farve).
6. Xylol, kanadabalsam.

Belægcellerne er gule med mørkblaa kjærne, hovedcellerne svagt lyseblaa med mørk kjærne, bindevævet rødt, muskelceller brune.

Eller man kan

1. Fixere og hærde friskt udskaarne stykker af maveslimhinde i Heidenhains sublimat (s. 85).
2. Udvaske 48 timer i rindende vand.
3. Skjære stykker i smaaportioner ca. 0.5 cm.
4. Udvaske grundigt i alkohol.
5. Paraffinindleiring (s. 101).
6. Snit farves paa objektglas (s. 118) 24 timer i Biondi-Heidenhains trefarveblanding (s. 156) eller ogsaa for slimcellerne i thionin (s. 153).

Merkel anvender karmin-indigo-karmin:

1. Frisk ventrikelslimhinde hærdes i Müllers vædske; derefter alkoholhærdning i mørke uden forudgaaende afvaskning i vand.
2. Indleiring i celloidin (s. 99).
3. Snit farves 24 timer (i varmeskab 2 timer) i

Karmin	2
Borax	8
Vand	130
hvortil sættes	
Indigokarmin . . .	8
Borax	8
Vand	130

4. Differentieres $^1/_2$ time i vandig mættet oxalsyreopløsning.
5. Undersøges og opbevares i glycerin eller kanadabalsam.

Hovedceller er farveløse, belægceller graablaa til mørkeblaa, muskelceller himmelblaa, kjærner røde.

Slimcellerne paa ventrikels overflade.

Tynde snit (paraffin bedst) farves i de almindelige hæmatoxyliner (slim lyst blaat) eller i thionin og tolnidin (s. 153), bismarkbrunt (slim mørkebrunt), safranin (slimcellerne kraftigt røde se s. 149) eller mucikarmin (s. 127).

Sekretkapillarer. Ganske frisk ventrikelslimhinde opklippes i smaa stykker og behandles efter Golgis kromsølvmethode (s. 161). Methoden er her som overalt noget lunet, men giver hvor den lykkes meget fine billeder.

Tarmkanalen.

Materiale fra menneske giver under almindelige omstændigheder ogsaa her mindre smukke præparater; tyndtarmens villi er saaledes for det meste blottede for epithel. Tarm af rovdyr (hund, kat), friskt fixeret og hærdet i Müllers formol (s. 88) eller Heidenhains sublimat (s. 85) og forøvrigt behandlet som for ventrikelen (s. 217) anført, giver de smukkeste billeder. Fixeringsvædsken bør indsprøites i selve tarmen, stykker som underbindes, og dernæst i sin helhed nedsænkes i vædsken.

Nerver i tarmvæggen.
(Auerbachs myenteriske og Meisners submucøse nervenet).

Et stykke tarm med tynd muskularis (kanin, marsvin) behandles efter Löwitz guldkloridmethode (s. 169). Tarmstykket fyldes først med 25 pct. myresyreopløsning, underbindes i begge ender og lægges i samme vædske, til det er bleven nogenlunde geleagtig gjennemsigtigt. Behandles paa samme maade med 1 pct. guld-

kloridopløsning ca. 20 min. og hensættes ca. 12 timer (mørkt) i ca. 25—30 pct. myresyre i glycerin (ogsaa tillige indsprøitet i varum). Naar reduktionen er fuldført, klippes tarmstykket i smaa firkanter, ca. 1 cm., med naal og fin pincet flaaes forsigtigt de to muskellag fra hverandre; det mycetteriske pleegus vil da følge det ene lag. Kan undersøges straks i glycerin eller hærdes i alkohol og deshydreres, indleires i kanadabalsam (s. 175).

Det meget finere submucøse plexus faaes sikrere frem paa fladt snit af den straks efter guldfarvningen hærdede og indstøbte tarm.

Spytkjærtler og pankreas.

Friskt materiale, smaa stykker, i alle fald snit gjennem den løse bindevævskapsel, saa fixationsvædsken godt trænger ind. Fixering og hærdning i Heidenhains sublimat (s. 85), Flemmings vædske (s. 84), Müllers formol (s. 88) med fornøden udvaskning og efterhærdning i alkohol. Indstøbning i celloidin eller helst i paraffin (s. 101), da der i regelen udkræves meget tynde snit. De almindelige kjærne- og protoplasmafarvninger, hæmatoxylin-eosin, karmin-pikrinsyre, vesuvin.

Slimceller farves i vesuvin, safranin, thionin, mucikarmin.

Gianuzzis halvmaaner (randcellekomplexer) efter Heidenhains hæmatoxylin-kromkali-methode (s. 133).

Sekretkapillærer efter Golgis kromsølvmethode (s. 161).

Lever.

Isolerede leverceller. Snitfladen gjennem en frisk lever vaskes med saltvand, skrabes let med kniven, det af-

skrabede undersøges i saltvand (ikke for lidet, ikke tryk paa dækglasset).

Eller smaa stykker af frisk lever macereres (s. 76) og rystes. Bundfaldet (centrifugeret om ønskes) optages med pipette.

Capsula Glissoni. Tynde skiver af frisk lever (1—2 mm. tykke) udsættes 12—24 timer for en vandstraale; lægges i vasken under springet i en liden staaltraadkurv, hvorved cellerne skylles ud.

Bindevævsbegrænsningen om de enkelte lobuli sees bedst paa svinelever. Hærdning i alkohol, snit uden indstøbning, farvning i van Giesons hæmatoxylin.

Levercellebjælkerne kan fremstilles ved vesuvin, hæmatoxylin og de fleste almindelige farvemethoder. Kommer meget klart frem ved farvning med Löfflers methylenblaat (s. 150), et par minutters forsigtig udskyllen i alkohol, kontrafarvning i vandig eosin $^1/_2$—1 pct. Øvelsessag, affarvningen i alkohol maa passes til den rette grad.

Galdekapillærer. Smaa stykker (ca. 0.5 cm. i alle dimensioner) af frisk lever behandles efter Golgis kromsølvmethode (s. 161). Tykke snit uden indstøbning.

Nyrer.

Til orienteringspræparater egner sig bedst æqvatorialsnit gjennem smaa usammensatte nyrer, f. eks. mus, marsvin, kanin eller katunge.

Isolerede nyrekanaler. Smaa stykker frisk nyre behandles 12—24 timer i ren saltsyre, hvorved bindevævet opløses, udvaskes i vand, nyrekanalerne isoleres ved let rystning.

Nyresubstans til almindelig undersøgelse deles i stykker af passende størrelse, saaledes at corticalsubstansen forbliver i forbindelse med den dertil svarende pyramide. Hærdes bedst i

alkohol, sublimat (s. 85) eller i Flemmings vædske (s. 84). Indstøbes i paraffin eller celloidin (s. 99, 101). Af nyre kan dog opnaaes ganske brugelige snit uden indstøbning. Snit bør lægges saavel langs de lige kanaler, altsaa lodret paa overfladen, som tværs gjennem pyramiden i forskjellig afstand fra dennes spids.

De fleste almindelige farvninger med hæmatoxylin, karmin, vesuvin osv. samt eosin, pikrinsyre eller van Giesons opløsning til kontrafarve kan bruges. Undersøges i glycerin, hvori epithelcellekonturer viser sig tydeligst, eller i kanadabalsam.

Den regelmæssige afveksling af de lige og snoede kanalers gebeter, ligesom ogsaa epithelet inde i glomeruli er tydeligst i ganske unge individers nyrer (nyfødte).

Ved Golgis kromsølvmethode (s. 161) træder i vellykkede præparater cellegrænserne i de snoede kanaler frem som bølgelinier.

Nyrebækken, ureter, urinblære

opklippes, spændes paa kork med epithelet frit; hærdes i alkohol, Müllers formol (s. 88). Indstøbes i celloidin, snit tværs gjennem væggen farves i hæmatoxylin-eosin (eller van Gieson).

Slimhindens epithel isoleres bedst i Ranviers alkohol (s. 76).

Blæren hos mindre dyr, marsvin, unge katte eller kaniner egner sig godt til studiet af glat muskulatur.

De sympathiske nerver med ganglier, der findes langs blærens sidekanter, undersøges ved Ehrlichs methylenblaat methode (s. 150) eller med guldklorid (s. 169), idet reagensvædskerne ogsaa indsprøites i blæren (kfr. tarmkanalens nerver s. 219).

Kjønsorganerne.

Testis.

Material af rotte, kanin, kat, hund i og udenfor brunsttiden; menneske, okse.

Oversigtspræparat. Testis og epididymis af nyfødt gut hærdes, efterat tunica albuginea er aabnet, i Müllers formol og efterhærdning i alkohol. Indstøbes i celloidin (s. 101). Snit lægges gjennem det største tværmaal. Vanlig farvning med hæmatoxylin, karmin, vesuvin osv. De koncentrisk anordnede septa, lobuli med snoede kanaler, rete og epididymis kan da faaes i et og samme præparat.

Tunica albuginea gjennemskjæres, stykker af passende størrelse fixeres og hærdes i Flemmings vædske (s. 84), Heidenhains sublimat (s. 85), Müllers formol (s. 88). Indstøbning i paraffin, meget fine snit, farvning i hæmatoxylin-eosin.

Ved undersøgelse af spermatogenesen maa tages samme hensyn som ved undersøgelse af kjærnedelingen: ganske friskt materiale, god fixation, tynde snit, passende farvning (s. 189).

Isolering af de enkelte celler ved maceration af friske stykker testis i Ranviers alkohol 30 pct.

Sperma, spermatozoer. Fra sædblærerne eller den overskaarne epididymis hos et nys slagtet dyr udpresses en ringe mængde opak vædske, hvori levende og bevægelige spermatozoer undersøges direkte. Kan indtørre paa glasset i tyndt lag, fixeres i alkohol, sublimat, Flemmings vædske; farves i hæmatoxylin. Kanadabalsam.

Vas deferens.

Stykker af et par cm.'s længde bindes til en pinde, hærdes i alkohol, Müller-formol, sublimat, deles i mindre stykker, indleires. Snit farves i de vanlige farvestoffe, hæmatoxylin, karmin, vesuvin.

Penis.

Materiale fra børn, hærdning i alkohol, Müllerformol. Indleiring i celloidin. Snit farves i hæmatoxylin-van Gieson.

Ovarium.

Oversigtspræparater bedst af mindre dyr (kat, kanin). Ovarier af større dyr bør kløves i tvær- eller længdeskiver, for at hærdningsvædskerne lettere kan trænge ind i det tætte ovarialvæv. Hærdning i Müllers vædske (s. 88), Müllerformol (s. 87) eller alkohol, grundig indstøbning i celloidin, vanlig farvning i hæmatoxylin, karmin, vesuvin.

Æg.

I ko-ovarier (faaes let hos slagterne) sees de Greef'ske follikler som større eller mindre blærer under overfladen. Folliklerne punkteres med spids kniv, indholdet opfanges paa objektglasset. Ægget viser sig i regelen omgivet af epithel fra cumulus proligerus.

Foetus.

Hinderne opklippes forsigtigt under saltvand eller anden indifferent vædske, fixeres og hærdes sammen med foetus i Kleinenbergs pikrin-svovlsyre (s. 86). Udvaskes og efterhærdes i alkohol. Farves en bloc i Grenachers eller Nikiforotos boraxkarmin (s. 126), Mayers karmalun (s. 124), Ehrlichs sure hæmatoxylin eller Sanfelices iod-hæmatoxylin (s. 132). Indleiring i paraffin med seriesnit (s. 101, 116).

Uterus, tuberne og vagina

behandles efter det almindelige arbeidsschema (se ovarium).

Mamma.

For en fuldkommen oversigts skyld bør saavel infantil som fuldt udviklet virginel og secernerende mamma undersøges.

Den egentlige kjærtelsubstans undersøges bedst i kjærtelens periferi. Papilleregionen viser de store melkegange og i selve papillen de talrige glatte muskler. Hærdning i Müller-formol (s. 87), alkohol, for secernerende mamma i Flemmings vædske (s. 84). Indleiring i celloidin eller paraffin, for cellestudier smaa stykker og tynde snit. Farvning i det vanlige hæmatoxylin-, karmin- eller vesuvinopløsninger; efter fixering i Flemmings vædske (mørke fedtkugler) kjærnefarvning med safranin efter Bödtker-Hermann (s. 149 147).

Sandseorganerne.

Øiet.

Oversigtspræparat gjennem det hele bulbus.

Det saa friskt som muligt enucleerede bulbus fixeres og hærdes i hel tilstand i Müllers vædske (s. 89) ca. 6 uger i værelsetemperatur, 14 dage i ca. 37° C. Udvaskes 24 timer i vand. efterhærdes i stigende alkoholer (80°—90—94 pct., endelig absolut, 24 timer i hver) paa bomuld høit i vædsken.

Øiet deles nu ved to snit parallele med dets naturlige horizontalæqvator, saaledes at der fremkommer en midtskive af corneas bredde og omfattende paa bagsiden papillen og macula lutea. Under delingen, der maa udføres med en tynd og skarp kniv, bør cornea vendes ned mod underlaget, saa at linsen af kniven trykkes mod iris og cornea og ikke luxeres ud af stilling. For at undgaa dette kan man først foretage delingen efter celloidinindstøbningen. Øiet bør da før denne gives et par meridiansnit gjennem sklera, saa deshydreringsvædsken og celloidinopl. trænger lettere ind; gjennemskjæringen foretages, naar øiet er

blevet haardt. For at orientere sig her bør man straks ved øiets udtagelse notere, om det er høire eller venstre, eller mærke m. rect. sup.; synsnerven udgaar i horizontalplanet lidt indad for macula.

Delingssnit gjennem selve horizontalæqvator er ikke heldigt, da netop de vigtigste partier af øiet derved gjennemskjæres.

Det til undersøgelse bestemte midtstykke deshydreres 24—48 timer i æther-alkohol (bytte vædske), indlægges i tynd celloidin i 4 dage, i tyk celloidin atter i 4 dage. Man lader nu celloidinen langsomt tørre ind og blive haard om og i præparatet, idet dette lægges i en ikke ganske tæt tillukket glasskaal, fæstes saa med flydende celloidin paa en blok, af stabilit eller træ, og hærder det fuldstændigt i 70—80 pct. alkohol.

Snit farves bedst i hæmatoxylin-eosin, deshydreres i benzin-alkohol (s. 176) og indleires i kanadabalsam.

De heldigste snit vil, naar snitplanet er rigtigt afpasset, gaa gjennem pupillen, papilla n. opt. og macula. For at undgaa ødelæggelse af de store snit bør disse ikke under behandlingen overføres fra den ene skaal til den anden; bedre er det at samle de snit man agter behandle i en skaal, hvor de hele tiden forbliver, idet man kun efterhaanden skifter de fornødne vædsker ved forsigtig athældning og paafyldning. Istedetfor spatel kan med fordel benyttes et stykke glat skrivpapir.

Cornea med epithel. Efter hærdning i Müllers vædske, udvaskning, efterhærdning i alkohol og indstøbning i celloidin (s. 99) eller paraffin (s. 101) farves snit, parallele eller lodret paa overfladen, med vanlige farvestoffe (hæmatoxylin-eosin).

Corneallegemer og cornealnerver. Frisk cornea behandles med guldklorid efter Löwits (s. 169) eller Ranviers (s. 169) methode. Kan undersøges i glycerin, bedst efter at cornea med naal og pincet er opdelt i lameller. Eller man hærder i alkohol, indstøber og gjør snit parallele med overfladen.

Linsen hærdes i Müllers vædske 8—14 dage koldt, udvaskes i vand, efterhærdes i alkohol (indstøbes). Snit i forønsket retning behandles som vanligt.

Linsefibre. Frisk udtaget linse macereres et par dage i Ranviers alkohol 33 pct., eller i Hayems vædske (s. 86), isoleres derefter ved udpillen med naal.

Chorioidea kan undersøges i frisk tilstand i glycerin, idet stykker løses med pincet, afklippes og udbredes paa objektglas. Saadanne stykker kan senere hærdes i alkohol, farves og indleires i kanadabalsam. Ogsaa fra det i sin helhed hærdede og gjennemskaarne øie kan præparatet hentes og undersøges enten i glycerin eller, efter vanlig behandling, i kanadabalsam. Om fornødiges, foretages først depigmentation.

Depigmentation foretages ved flere oxyderende midler. Unna anbefaler at lægge præparaterne i vandstofhyperoxyd, der tillige afbleger osmium-, guldklorid- og kromfarvninger. Leopold Müller lader celloidinsnit udvaske i vand, dernæst ligge 48 timer i H_2O_2 i sollys, paa mørke dage længere, dernæst tilbage i alkohol. P. Mayer anvender chlor in statu nascenti (klorsur kali i saltsyrealkohol); Grenacher depigmenterer i en blanding af

Glycerin 1
Alkohol 80 pct. . . 2
dertil
Saltsyre til 2 à 3 pct.

Alfieri depigmenterer celloidinsnit i en opløsning af $^1/_2$ ‰ overmangansur kali, 8—10—24 timer efter pigmentmængden, gjerne i direkte sollys Naar snittene har faaet en mahognibrun farve, lægges de i en $^1/_3$ pct. oxalsyreopløsning, til fuldkommen depigmentering indtræder (et par timer). Udvaskes grundigt i vand. Strukturen vedligeholdes godt, men snittene bliver lidt skjøre, og farves noget langsomt.

Jander fixerer og hærder, deshydrerer og lægger saa præparaterne 12—48 timer i

Kromsyreopl. 1 pct. . 70 cc
Salpetersyre . . . . . 3 »
Vand . . . . . 200 »

indtil pigmentet svinder. Voluminøse stykker skjæres først og depigmentationen foretages i de med æghvideopløsning paa objektglas fæstede snit.

Retina. Tværsnit til oversigt faaes ved de almindelige snit gjennem hele bulbus eller øiets samtlige hinder. Finere snit opnaaes ved snit af retina alene. Det friske bulbus klippes da over i den lodrette æqvatorlinie, glaslegemet presses forsigtig ud, hvorpaa øiets bagerste halvkugle krænges ud, saa retina spændes over dets konvexitet; hærdes i Müllers vædske, Müller-

formol (s. 88) med vanlig udvaskning i vand og efterhærdning, afløses forsigtig, passende stykker udklippes, indstøbes i celloidin eller paraffin. Farvning en bloc eller i snit med hæmatoxylin.

Stav- og taplag. Isolerede retinadele. Friskt øie halveres, glaslegemet udpresses, smaa stykker af retina udklippes og pilles i glaslegemet eller i saltvand 0.6 pct. Dækglasset maa ikke trykkes, lægges derfor paa lave voksfødder.

Bedre isolation faaes, hvis øiet først fixeres i 1 pct. osmiumsyre et par timer, overskjæres i sin æqvator og macereres 1—3 dage i vand, smaa stykker udklippes og pilles i vand. Kan senere farves under dækglas i pikrokarmin osv.

Øine af mennesker kan kun meget sjelden erholdes i tilbørlig frisk tilstand; i de fleste andre pattedyr er retinaelementerne meget smaa, saa de mikroskopiske billeder bliver utydelige. Hensigtsmæssigst anvendes øine af frosk, triton eller fisk.

Retinacellerne kan farves i frisk retina efter Golgis kromsølvmethode (s. 161); lader man retina ligge i ōsbikromat-blandingen fra 12—72 timer, faar man farvning af forskjellige cellearter alt efter tidsvarigheden. Ligesaa giver Ehrlichs methylenblaat-methode (s. 150) med farvning af frisk retina i 20—40 min. smukke resultater. Ogsaa Nissl's ganglie-cellefarvninger (s. 152, 206) anvendes.

Øret.

Til undersøgelser over det indre øre egner sig bedst materiale fra nyfødte musunger, ligesaa fra marsvin eller kanin. Til præparater af menneske tages helst øre af smaabørn (nyfødte).

Lenhossék fjerner paa musunger (indtil 10 dage gamle) hele lacunar og kjæven og behandler basis cranii efter Golgis kromsølvmethode (s. 164), fæster stykket paa en træklods med celloidin og skjærer i 80 pct. alkohol; opklares og monteres i kanadabalsam uden dækglas. Dekalcinering er ufornøden.

Hos ældre individer og større dyr maa der dekalcineres, før skjæringen kan finde sted.

Efter udtagelsen af pars petrosa aabnes bulla, og det indre øre udtages, cochlea befries for de omgivende ben og aabnes forsigtigt med kniv eller fil

paa et eller to steder for at skaffe adgang for fixerings- og dekalcinationsvædsken i det indre; aabningen bør ske under vædske for at undgaa luftens indtrædelse i det indre øres hulheder.

Fixeres i Flemmings vædske (s. 85) i 4—6 timer, udvaskes i rindende vand 1—2 timer, — eller fixeres i Müllers vædske tilsat 1 ‰ osmiumsyre 6—7 dage og udvaske 12 timer i rindende vand.

Derefter, om fornødiges, dekalcinere i Waldeyers krom-salpetersyre 4 : 1 : 200 (s. 94) eller Hougs phloroglucin-salpetersyre. Stöhr anbefaler til dekalcinering her

Klorpalladium 1 pct. .	1
Saltsyre	10
Vand	100

den hele portion til dekalcinering af en cochlea; vædsken maa oftere veksles.

Udvaskes grundigt i vand, hærdes i stigende alkoholer, farves en bloc i boraxkarmin (s. 123). Indstøbe i paraffin.

Længdesnit gjennem midten af modiolus giver de bedste oversigtspræparater, paa tværsnit kan man faa brugbare fladebilleder af organon Corti.

Stöhr anbefaler for disse sidste at aabne cochleas spids, fixere præparatet 12—20 timer i ½ pct. osmiumsyre, udvaske 1 time i vand, hærde det et par uger i rigelig Müllers vædske. Cochlea brydes da op, lamina spiralis udtages forsigtigt med naale og undersøges i glycerinvand med den vestibulære flade opad.

Undersøgelser af øret hører til de vanskeligste histologiske arbeider, der fordrer nøie kjendskab til ørets anatomiske bygning og adskillig teknisk færdighed.

Næseslimhinden.

Hovedet af en netop dræbt kanin sages over paa langs i midtlinien, saa næsehulen aabnes.

Slimhinden i den nederste, respiratoriske del udskjæres og afløses forsigtig i smaa regulære stykker, fixeres og hærdes i sublimat, formol eller alkohol, indleires. Farves i hæmalun-eosin, boraxkarmin, lithion-karmin.

Den olfaktoriske del af næseslimhinden. Isolering af lugteceller udføres efter Ranvier ved maceration af smaa stykker slimhinde et par timer i 33 pct. alkohol, hvorefter fixering 10—15 minuter i 1 pct. osmiumsyre, udpillen i vand, undersøgelse og opbevaring i glycerinvand.

I sammenhæng med slimhinden forøvrigt undersøges de efter Golgis kromsølvmethode, der ogsaa viser nerverne.

Oversigtssnit af hele slimhinden erholdes, idet smaa stykker af samme hærdes i alkohol, indstøbes i celloidin. Snit farves i hæmalun eosin (s. 138) eller van Giesons farve (s. 139).

Glandulæ olfactoriæ træder meget smukt frem ved farvning af snittene i Sanfelices iod-hæmatoxylin og udvaskning i eddikesur kali.

B. Pathologiske objekter.

Ved den mikroskopiske undersøgelse af pathologiske gjenstande vil teknik og fremgangsmaade i det store og hele taget falde sammen med de for vedkommende normale vævsdele brugelige.

Imidlertid er der i mange tilfælde ogsaa brug for særegne methoder, ligesom der ved pathologiske undersøgelser kan blive hensyn at tage, som ikke udkræves ligeoverfor undersøgelser af normale objekter.

Idet der derfor med hensyn til præparaternes almindelige behandling: fixering, hærdning, farvning, indstøbning, skjæring osv. henvises til, hvad der er meddelt om vedkommende væv og organer i normal tilstand, vil i det følgende kun saadanne methoder omtales, der blot anvendes ved undersøgelsen af pathologiske gjenstande.

I. Mikroskopisk undersøgelse af mikroorganismer.

a. Bakterier.

Til bakterieundersøgelser trænges et mikroskop med kraftige forstørrelser — specielt oljeimmersion (s. 20), samt Abbes belysningsapparat. Ufarvede bakterier undersøges med mere eller mindre lukket blænder, farvede bakterier med aaben blænder (s. 48).

Bakterier, der findes frit opslemmede eller som bundfald i en vædske (vand, bouillon osv.), kan direkte undersøges i denne, idet en draabe deraf med pipette overføres paa objektglasset, dækkes med dækglas, og præparatet er færdigt.

Denne maade er dog lidet tilfredsstillende og egner sig kun til foreløbig undersøgelse. Den objektivlinsen og dækglasset forbindende seige oljedraabe overfører let alle indstillingsbevægelser til selve vædsken og foranlediger her gjerne forstyrrende bevægelser.

Adskillige fordele yder undersøgelse i hængende draabe, særlig anvendt for at undersøge bakteriernes egenbevægelse. Hertil udkræves et objektglas med en liden hulslibning paa den ene flade. En liden draabe af den bakterieholdige vædske anbringes paa et dækglas, der nu med draaben nedad lægges over hulslibningen, som paa forhaand er omgivet med en smal vaselinrand. Draaben svæver nu frit i hulningen, som er lufttæt lukket ved vaselinranden, der ogsaa hindrer forskyvningen af dækglasset.

Mest benyttet ved bakterieundersøgelser er dog de saakaldte dækglaspræparater eller tørpræparater. Disse fremstilles saaledes:

En liden draabe eller partikel af det bakterieholdige stof udbredes i et ganske tyndt lag paa dækglas; ved seige og mindre tyndtflydende masser (f. eks. expektorat, caverneindhold osv.) udgnides smaadele deraf mellem 2 dækglas til en tynd hinde, hvorefter dækglassene trækkes fra hverandre ved en glidende bevægelse.

De saaledes besmurte dækglas henlægges for at lufttørres (lufttørringen kan paaskyndes ved forsigtig opvarmning paa en rugeovn eller over fri flamme). Naar præparaterne er tørrede, flammefixeres de, ɔ: de føres med en fart som pendelen paa et slaguhr 3 gange gjennem en spiritus- eller gasflamme med den besmurte side opad, hvorved præparatet fæstes bedre til dækglasset, og mikroorganismerne bliver mere skikkede til senere at optage farvestoffe.

Som regel bør man forfærdige flere, f. eks. 4—6 saadanne dækglaspræparater med en gang for at have adgang til senere at anvende forskjellige farvninger og behandlingsmaader.

De saaledes lufttørrede og flammefixerede dækglaspræparater er straks færdige til at farves og undersøges; men de lader sig ogsaa uden ulempe opbevare gjennem længere tid og egner sig godt til transport, hvad der kan være af betydning, naar man paa stedet er hindret fra at fuldende undersøgelsen.

I praxis, særlig ved undersøgelse af pathol. sekreter, bruger man ofte at udbrede dette paa objektglasset, tørre som beskrevet, farve og undersøge uden dækglas, idet immersionsoljen anbringes lige paa de indtørrede masser.

Dækglas-(og objektglas-)præparater af bakterier farves væsentlig med de basiske anilinfarver (s. 143); især benyttes methylenblaat, methylviolet, fuchsin, vesuvin, dels i simple tynde vandige opløsninger, dels med tilsat beis (Löfflers alkaliske methylenblaat, anilin-methylviolet, karbolfuchsin osv.).

Da de vandige opløsninger ikke er synderlig holdbare, gjør man i praxis rettest i at have staaende færdig en koncentreret alkoholisk opløsning af de brugeligste farver, opbevaret paa ca. 50 gr.s flasker, der er lukkede med smaa øienpipetter. Et par draaber af den alkoholiske opløsning fortyndes med vand i et uhrglas, og farven er færdig. Ogsaa de med anilinvand lavede farver bør tilberedes for anledningen: i et reagensrør rystes et par cc. anilinolje med rigeligt vand og filtreres i et uhrglas, hvorpaa farven tilsættes (s. 145).

Et par draaber af farveopløsningen dryppes paa dækglassets besmurte side, eller dette lægges med denne side ned i en skaal, som indeholder lidt af farvevædsken. Efter en tid af fra ca. $^1/_2$ minut op til $^1/_2$ time, efter vedkommende bakteriearts evne til at optage farve, udvaskes præparatet i vand, eller hvor det synes overfarvet, i 70 pct. alkohol, $^1/_2$—1 pct. eddikesyre eller saltsyre-alkohol med efterfølgende vandskylling, og kan da enten undersøges i vand, eller efter tørring med filtrerpapir og i luften indleires i kanadabalsam. Kan ved gode farvninger og grundig udvaskning af alkohol og syre blive ganske holdbare.

En meget skaansom maade til affarvning er ved efterfarvning med en substituerende kontrastfarve (eosin, fluoreceïn, vesuvin s. 121, 236).

Ved rigtig at afpasse affarvningen kan man erholde isoleret farvning af bakterierne.

Endnu bedre opnaaes dette med en del bakteriearter ved Grams (eller Weigerts) anilin-iod-gentiana-farvninger (s. 147).

Denne Grams farvning er som diagnostisk kjendetegn af megen vigtighed, idet morfologisk meget ens udseende arter ofte kan skjelnes fra hinanden efter deres evne til at farves eller ikke farves ved Grams methode.

Af de almindeligst forekommende pathogene bakteriearter

farves efter Gram:	farves ikke efter Gram:
Miltbrandbacillen.	Tyfusbacillen.
Tuberkelbacillen.	Snivebacillen.
Leprabacillen.	Det maligne ødems bacille.
Difteribacillen.	Raslesygebacillen.
Kluseseptikæmibacillen.	Hønsekolerabacillen.
Tetanusbacillen.	Kolerabacillen.
Streptokokker.	Pneumonibacillen (Friedländer).
(Grycipelas, pyæmi, phlegmone.)	Gonokokken.
Staphylokokkus pyogenes aureus.	Recurrensspirochati.
Diplokokkus pneumoniæ (Fränkel).	
Mikrokokkus tetragenes.	
Aktino myces.	

Grams (og Weigerts) methode egner sig ogsaa meget godt for bakterier i snit, som paa forhaand kan være farvede i vesuvin eller karmin, hvorved cellekjærner og vævet overhovedet faar en mod de efter den Gramske methode dybt sortblaa bakterier tydeligt afstikkende farve.

En del bakteriearter udkræver særlige farvemethoder, saaledes f. eks. tuberkelbacillen, ligesom der for fleres vedkommende er specielle hensyn at tage.

De i praxis hyppigst forekommende bakterieundersøgelser foretages saaledes:

1. Streptokokker, staphylokokker (erysipelas, abcesser, pus).

Af kulturer, pus eller vævssaft gjøres dækglaspræparat (s. 231); farves i tynde vandige fuchsin- eller methylenblaat-opløsninger, afvaskes i vand. Positiv til Gram ɔ: farves efter Grams methode (s. 147).

Snitpræparater farves paa lignende maade. Da erysipelaskokker affarves ved Bismarckbrunt (vesuvin), bør denne farve ikke anvendes til kontrafarvning af vævet.

2. Gonokokker farves i regelen med vandig alkoholisk methylenblaat eller ogsaa Löfflers alkal. methylenblaat. Ved denne synes gonokokken dog at svulme lidt op, saa den karakteristiske spræk mellem de to sammenhængende kokker blir mindre tydelig.

Methylenblaatfarvet gonokokpræparat kan med fordel kontrafarves i eosin.

Skarp og uden at fremkalde opsvulmning men noget mindre intens bliver gonokokfarvningen med tynd vandig (rødvinsfarvet) fuchsinopløsning.

Lanz farver gonokokker saaledes. Dækglas-(objekt-)præparater lægges $^1/_4$—$^1/_2$ minut i

Mættet fuchsinopl. i 2 pct. karbolvand . . 1
Mættet thioninopl. i 2 pct. karbolvand . . 4

Afvaskes i vand. Kan undersøges straks heri eller (efter tørring) i kanadabalsam.

3. Pnevmoni-diplokokker (Fraenkel) ɔ: diplococcus lanceolatus, meningococcus.

Dækglaspræparater farves i tynde vandig-alkoholiske opløsninger af fuchsin, methylenblaat eller methylviolet. Selve bakterien farves meget kraftigere end kapselen. Positiv til Gram, hvorved kapselen bliver ganske ufarvet.

4. Pnevmoni-bacillen (Friedländer) farves i de vanlige vandig-alkoholiske tynde anilinfarveopløsninger, men er negativ til Gram.

5. Tyfusbacillen lader sig kun vanskeligt farve i vandige opløsninger; svagest farves den i methylenblaat, bedre i fuchsin og gentianaviolet, ligesom ogsaa i Löfflers alkaliske methylenblaat (s. 150) og Kühnes karbolmethylenblaat eller karbolfuchsin (s. 150), hvorefter dækglaspræparater blot behøver at udvaskes i vand. Farvningen foregaar lettere under opvarmning.

Snitpræparater maa ligge 24 timer i Löfflers methylenblaat, Kühnes karbolmethylenblaat eller i karbolfuchsin og afvaskes i vand.

Tyfusbacillen farves ikke efter Gram.

Angaaende snertfarvning se side 239.

6. Bacterium coli commune forholder sig til farvestoffe som tyfusbacillen.

7. Difteribacillen farves paa dækglaspræparat bedst i Löfflers methylenblaat. Positiv til Gram. I snitpræparater som tyfusbacillen eller ved Weigerts fibrinfarvning (s. 147).

8. Influenzabacillen farves ved de almindelige vandige anilin farvestoffe. Negativ til Gram.

9. Tuberkelbacillen udmærker sig ved den vanskelighed, hvormed den saavel optager som atter afgiver optagne farvestoffe. Den farves saaledes ikke i de almindelige vandigt-alkoholiske anilinfarveopløsninger. Farveoptagelsen lettes og paaskyndes ved tilsætning af beis til farvevædsken samt ved opvarmning af denne. Ved farvning i vædske af værelsetemperatur lader man præparaterne ligge 12—24 timer i farvevædsken, i rugetemperatur 1—2 timer, ved ophedning til begyndende kogning foregaar farvningen momentant. Det bør

erindres, at snitpræparater ødelægges ved for stærk opvarmning, de bør ikke udsættes for mere end rugetemperatur..

Tuberkelbacillen farves i Löfflers methylenblaat, ved Kühnes karbolmethylenblaat-(fuchsin)-methode (s. 150) og ved Grams farvning (s. 147).

Ved differentialdiagnostiske farvninger benytter man sig af tuberkelbacillens evne til at modstaa saavel forskjellige mineralsyrers, som alkoholens og substituerende farvestoffes (s. 121) affarvende evne; den farvede tuberkelbacille er baade syrefast og alkoholfast.

Der er angivet en hel del saadanne for tuberkelbacillen mere eller mindre specifike farvninger, hvorved man kan adskille den fra de tinktionelt og morfologisk nærmest staaende mikrober: lepra- og smegmabacillerne.

Koch-Ehrlichs methode: Dækglaspræparater opvarmes i anilinvand-fuchsin (eller gentianaviolet), affarves et par sekunder i fortyndet salpetersyre (1 del koncentreret salpetersyre + 6 dele vand), udvaskes i 70 pct. alkohol, til intet farvestof mere afgives, skylles i vand, kontrafarves i vandig methylenblaat (eller vesuvin). Kan straks undersøges i vand, eller efter tørren (over flamme) i kanadabalsam.

Snitpræparater farves koldt eller i rugetemperatur, deshydreres efter affarvningen, opklares i ætherisk olje og undersøges i kanadabalsam.

Tuberkelbacillerne bliver her røde (eller violette), de andre i præparatet existerende mikroorganismer og kjærner blaa (eller brune).

Gabbet-farvning kombinerer affarvningen og kontrafarvningen i et tempo saaledes: Dækglaspræparater farves i karbolfuchsin koldt i løbet af 2 minuter, afvaskes i vand, affarves og kontrafarves 1 minut i methylenblaat 1—2 gr. opløst i 100 gr. 25 pct. svovlsyre. (Røde tuberkelbaciller, blaa kjærner og mikroorganismer forøvrigt).

Methoden er hurtig, men maaske mindre sikker, hvor bacillerne er lidet livskraftige, da farvetiden er saa kort og syrevirkningen meget intens.

I det hele taget er affarvningen med de stærke mineralsyrer neppe altid ganske heldig, da mindre stærkt farvede tuberkelbaciller derved kan tabe sin farve og saaledes oversees.

B. Fraenkels methode ligner Gabbets, kun anvender Fraenkel anilinvandfuchsin og til affarvning og kontrafarvning en vædske bestaaende af

Salpetersyre . 20
Alkohol . . . 30
Vand 50
Methylenblaat til mætning.

Günther roser meget følgende fremgangsmaade:

Under opvarmning i uhrglas, til de første blærer stiger op, farves dækglaspræparater i friskt tilberedt anilinfuchsin, hvorpaa vædsken staar og afkjøles 1 minut. Dækglasset lægges derpaa 1 minut i 3 pct. saltsyrealkohol, hvori det bevæges frem og tilbage med pincetten; afskylles godt i vand, kontrafarves let i tynd vandig (eller alkoholisk-vandig) methylenblaat, afskylles atter i vand, aftørres, trækkes 3—10 gange gjennem flammen, undersøges i xylolkanadabalsam.

Den sidste opvarmning af det færdige præparat gjør farvningen kraftigere og mere holdbar, idet de sidste spor af syren fjernes (Unna).

En lignende methode, der ogsaa medfører gode resultater, er:

Farvning under opvarmning i uhrglas, til de første blærer sees (eller 24 timer i vanlig temperatur) i karbolfuchsin (s. 145) (der er meget holdbar og saaledes ikke altid maa tilberedes frisk); affarvning et par minuter i 1 pct. saltsyrealkohol (dækglasset bevæges i vædsken), udvaskning i 70 pct. alkohol, kontrafarvning i Löfflers methylenblaat, undersøgelse i vand eller efter tørring af præparatet i xylol-kanadabalsam.

Methoden et skaansom og precis.

Egner sig ogsaa godt for snitpræparater, dog her uden opvarmning.

Ved Weichselbaums og Czaplewskis methoder undgaaes ganske brugen af mineralsyrer.

Weichselbaum farver tuberkelbaciller i dækglaspræparater i karbolfuchsin (s. 145) under opvarmning til blæredannelse, afvasker i vand og kontrafarver et par minuter i koncentreret alkoholisk methylenblaatopløsning, til præparatet er helt blaat.

Czaplewski farver ligeledes i varm karbolfuchsin, affarver derimod først i

Fluoresceïn . . } mættet alkoh. opl.
Methylenblaat . }

dernæst i

Methylenblaat » » »

Tuberkelbacillerne farves let i væv hærdet i alkohol eller sublimat, dels efter forudgaaende kjærnefarvning, eller med denne som kontrafarvning, som ved dækglaspræparater. Celloidinindstøbning hindrer ikke farvningen.

Israel anbefaler følgende fremgangsmaade:

1. Smaa vævsstykker fixeres 1 time i mættet sublimatopløsning.
2. Efterhærdes i alkohol 96 %.
3. Indstøbes, skjæres.
4. Snit farves 1—2 min. i Bøhmers hæmatoxylin. Afvaskes i vand.
5. Farves videre 3—5 min. i karbolfuchsin.
6. Differentieres i Grams iodiodkal. opl., ikke over 1 minut.
7. Affarves i anilinolje, anilinxylol-xylol.
8. Xylol-kanadabalsam.

Letulles tuberkelbacillefarvning i snit af præparater hærdede i Müllers vædske.

1. Snit udvaskes grundigt i vand.
2. Kjærnefarves med hæmatoxylin eller hæmalun (s. 129). Udvaskes i vand.
3. Farves i mættet rubinopl. i 2 % karbolvand (karbolfuchsin) 10—15 min.
4. Hurtig udvaskning i vand (1 min.), derefter i abs. alkohol (1/2 min).
5. Kontrafarvning 5 min. i { Iodgrønt 1.00. / Karbolvand 2% 100.00. }
6. Udvaskning i abs. alkohol til deshydrering.
7. Bergamotolje, xylol, kanadabalsam.

9. Leprabacillen staar tuberkelbacillen nær i henseende til farveevne, er træg med hensyn til farvestoffenes optagelse og afgivelse, dog ikke i saa høi grad som tuberkelbacillen. De fleste ved denne anvendelige farvemethoder kan saaledes ogsaa benyttes ved leprabacillen, idet dog bør erindres, at medens leprabacillen ligesom tuberkelbacillen er «syrefast» ɔ: fastholder et optaget farvestof trods senere indvirkning af mineralsyrer, er den ikke saa «alkoholfast» — den afbleges gjerne ved alkoholudvaskning efter syreindvirkning. Den skiller sig bestemt fra tuberkelbacillen ved sin evne til at lade sig farve i tynde vandige anilinfarveløsninger, særlig i tynd fuchsinopløsning, hvori tuberkelbacillen ikke farves (Baumgarten).

10. Ogsaa de saakaldte smegmabaciller (ligesom saadanne mikrober, hvis evne til at fastholde farvestofferne er øget ved kultur i smør- eller lanolinholdige medier), der farves som tuberkelbacillen og modstaar mineralsyreblegning, affarves ved efterfølgende grundig alkoholvaskning. Smegmabacillen farves ogsaa paa den for syfilisbacillen af Lustgarten angivne vis.

11. «Syfilisbacillen» farves efter Lustgarten saaledes:

1. Anilinvand-gentianaviolet 12—1, 24 timer, ved 40° C. 2 timer.
2. Udvaskes i alkohol.
3. Hypermanganas-kalic. opl. 1,5 % 10 sek. } Kan gjentages kort flere gange.
4. Svovlsyrlingopl. til fuldstændig affarvning. } (NB! glasinstrumenter).
5. Afvaskning i vand.

Ogsaa smegmabacillen farves paa denne maade. Syfilisbacillen derimod affarves efter tuberkelbacillefarvning meget let ved mineralsyrer, medens smegmabacillen da fastholder farven.

12. Koleravibrioner farves i dækglaspræparater som i snit enten ved fortyndet karbolfuchsin, 1:5, (ufortyndet karbolfuchsin bringer mindre gode billeder) eller efter Kühnes universalmethode (s. 150).

13. Recurrens-spirillen kan farves som almindelige dækglaspræparater. Farves ikke efter Gram.

I blodpræparater farves recurrens-spirochæten isoleret efter Günthers methode.

1. Blodpræparater fixeres og tørres paa dækglas som vanligt, tyndt lag (s. 203, 231).
2. Hæmoglobinen extraheres og plasma fjernes ved ca. 10 sek. afspylen i 1—5 % vandig eddiksyreopl.

   Gamle dækglaspræparater, der er opbevarede i længere tid, og hvor plasma saaledes er stærkt fixeret, behandles heller med 2—3 % pepsinopløsning.
3. Vædsken blæses af dækglasset ved hjælp af en pipette, lufttørres. Overskud af syre neutraliseres om nødvendigt ved at holde præp. over mundingen af en ammoniakflaske.
4. Farves i en af de vanlige bakteriefarver (methylenblaat, fuchsin, methylviolet).
5. Afvaskes i vand, tørres i xylol-kanadabalsam.

Blodlegemerne sees kun som blege skygger, kun kjærner og bakterier er farvede.

Methoden kan ogsaa anvendes i sin almindelighed ved undersøgelse paa mikroorganismer i blod.

Mamurowski farver dækglaspræparater af recurrensblod koldt 1—2 timer i mættet alkoholisk eosinopl., derefter 20—30 min. under opvarmning i mættet vandig methylenblaat. Afskylles, tørres, undersøges i kanadabalsam. Bakterierne er da blaa.

14. Aktinomyces, straalesop. I præparater af de gule gryn i pusset, udgnedne paa dækglas (tørrede osv.) saavel som i snit, farves straalesoppen efter Grams methode (s. 147) med Günthers modification (ɔ: efter farveextractionen med alkohol foretages endnu en affarvning 10 sekunder med 3 pct. saltsyrealkohol). Den til farvevædsken benyttede alkoholiske methylviolet- (gentiana) opl. maa være absolut mættet. Ogsaa Weigerts modification er anvendelig (s. 147).

Farvningen tager sig bedst ud efter foregaaende vævsfarvning i pikrokarmin (s. 125), hvorved selve soppens kolber blir gule, vævskjærnerne røde. Selve sopmycelet er blaat.

Man kan ogsaa vævsfarve med vesuvin efter sopfarvning efter Gram.

Med Israels orcëin (s. 139) farves aktinomycesklumperne meget intens ved ca. 30 minuters henliggen i farven; skiller sig ved sin brunrøde farve kraftigt fra det blaaligtfarvede væv.

Sporefarvning.

Bakteriernes sporer optager kun vanskelig farvestoffe, men giver ogsaa kun langsomt slip paa dem, omtrent som tilfældet er med tuberkelbacillen o. fl. For at farve sporer kan man derfor gaa frem omtrent paa samme maade som ved tuberkelbacillefarvning, dog saaledes at sporekapselen ved ophedning eller macerering gjøres mere gjennemtrængelig for farvestofferne. (Ernst).

Isoleret sporefarvning.

1. Lufttørrede dækglaspræparater trækkes 10—20—30 gange gjennem flammen eller opvarmes 15—30 min. til en temperatur af 150—180° C. (paa metalplade eller i tør sterilisationskasse).
2. Farves i vanlig vandig fuchsin eller methylenblaatopløsning (varmt).
3. Afvaskes, tørres, kanadabalsam. Kun sporerne viser sig farvede, bakterierne selv farveløse.

Vil man ogsaa have bakterieprotoplasmaet farvet, kan man anvende følgende:

Sporefarvning med dobbeltfarvning.

1. Dækglaspræparat, fremstillet som vanligt med 3 ganges passage gjennem flamme, opvarmes $^1/_2$—1 time i karbolfuchsin. Vædsken kan gjerne bringes gjentagne 5—6 gange i kog, maa fornyes, eftersom den fordamper.
2. Affarves ca. 1 min. i 5 pct. salpetersyre eller noget længere tid i saltsyrealkohol.
3. Afvaskes i vand.
4. Kontrafarves i Løfflers methylenblaat.
5. Afvaskes i vand.
6. Tørres med filtrerpapir paa objektglas.
7. Indleires i kanadabalsam.

Sporerne er her glinsende røde, protoplasmaet blaat.

Møllers sporefarvning med dobbeltfarvning.

1. Dækglaspræparat fixeres ved at passere flammen 3 gange eller 2 min. i abs. alkoh.
2. To minuter i chloroform (for at fjerne fedt).
3. Afskylles i vand.
4. Macerering $^1/_2$—2 min. i 5 pct. kromsyre.
5. Nøiagtig udvaskning i vand.
6. Farvning i karbolfuchsin under ophedning til kogning ca. 1 min.
7. Affarvning i 5 pct. svovlsyre.
8. Afvaskning i vand.
9. Kontrafarvning i methylenblaat.
10. Afskylles i vand, tørres, kanadabalsam.

De forskjellige bakteriers sporer er af noget forskjellig farveevne, saa resultaterne gjerne blir noget varierende.

Svingtraadfarvning.

Svingtraaden, snerten (cilium) hos de bevægelige bakteriearter kan kun hos de allerstørste arter sees direkte uden nogen præparation i hængende draabe (Günther).

R. Koch paaviste svingtraade først paa indtørrede ufarvede præparater. Efter Günther faar man paa følgende maade gode resultater, forudsat at de benyttede bakteriers cilier ikke er for smaa:

1. Den bakterieholdige vædske udbredes tyndest muligt paa dækglasset. Lufttørres. Ophedes ikke.

2. Dækglasset lægges paa objektglas enten paa en papirramme eller paa lave voksfødder.
3. Omgives af en beskyttende rand af kanadabalsam eller maskelak.

Præparatet, der saaledes er luftindleiret, viser med stærk forstørrelse (oljeimmerssion) og passende valgt blænderaabning ganske tydelige svingtraade.

Löfflers farvemethode til svingtraad lykkes bedst i unge kulturer, hvor bakterierne viser sig livligt bevægelige; ogsaa kulturmediet bør være friskt; hensigtsmæssigst er det at tage materialet fra agar-overflade-kulturer.

1. Bakteriemateriale frit for slimstoffe eller gelatine udbredes i tyndest mulige lag paa et absolut rent dækglas (vaskning i salpetersyre, afvaskning i vand, opbevaring i absolut alkohol). Ved altfor stor bakterierigdom fortyndes materialet med en vanddraabe paa dækglasset.
2. Lufttørres, flammefixeres 3 gange uden stærk opvarmning.
3. Beises $^1/_2$—1 minut i vel rystet og frisk filtreret Löfflers beis (eller fuchsinblæk):

   Tannin 2 cc. opl. i
   Vand 8 cc.
   hvortil sættes:
   Mættet vandig opl. af jernvitriol 5 cc.
   » alkoh. fuchsinopl. . . . . 1 cc.
4. Udskylles i rindende vand.
5. Vandet aftørres, dækglasset lufttørres fuldstændigt.
6. Farves, idet en draabe af farvevædsken opvarmes til dampdannelse paa det horizontalt holdte dækglas, hvorefter farven yderligere lades indvirke 1 min.

   Som farve benyttes enten 1) fuchsin- (eller methylviolet-) anilinvand (s. 145) filtreret direkte paa dækglasset eller 2) frisk lavet(!) almindelig vandig-alkoholiske fuchsinopl.
7. Afvaskes omhyggeligt, tørres; kanadabalsam.

Trods alle forsigtighedsregler og det nøiagtigste arbeide er denne snertfarvning dog vanskelig og lunefuld og giver afvigende resultater ved forskjellige bakteriearter. Er heller ikke meget holdbar.

Löffler har fundet, at visse bakteriers svingtraade farves bedre, naar beisen gjøres mere alkalisk ved draabevis tilsætning af 1 pct. natronlud, andre naar den syres ved svovlsyre, og ifølge Petruschki saaledes, at de syredannende bakterier trænger alkalitilsætning, alkalidannende syretilsætning til beisen kvantitativt overensstemmende med mængden af det dannede alkali eller syre. Ved farvning af svingtraaden hos koleraspirillen tilsættes lidt svovlsyre, for tyfusbacillen natronlud. Nicolle og Morax anser varigheden af beisens indvirkning for det vigtigste, de beiser om fornødiges gjentagne gange og under stærkere opvarmning, med omhyggelig afvaskning efter hver gang.

van Ermengems methode til svingtraadfarvning beror paa en reduktion af sølvsalte i svingtraaden.

1. Dækglasset renses absolut for fedt og organiske substanser ved kogning i

Bikrom. kal. . . 60
Konc. svovlsyre . 60
Vand 1000

grundig udskyllen i vand, dernæst i abs. alkohol, hvorefter de stilles paa kant og lufttørres vel beskyttede mod støv.

2. En ung frisk kultur udbredes tyndest muligt — fortyndet med vand, om fornødiges — paa dækglasset, lufttørres, flammefixeres 3 gange (dækglasset holdes i fingrene for at undgaa overhedning).

3. Fixeres $^1/_2$ time i værelsetemperatur, 5 min. i 50—60 ^{0} i «bain fixateur».

Osmiumsyre 2 pct. . . . . 1 vol.
Tanninopl. 10—25 pct. . 2 »

(Til 100 cc af denne blanding desuden 4—5 draaber iseddik.)

4. Udvaskes omhyggeligt i vand, derpaa i alkohol.

5. Dyppes faa sekunder i «bain sensibilisateur»:

Sol. nitr. argent $^1/_4$—$^1/_2$ pct.

6. Derefter uden afvaskning i «bain réducteur et renforçateur»:

Acid. gallic. . . 5.00
Tannin 3.00
Acet. natr. fus. . 10.00
Vand (destill.) . 350.00

og derpaa tilbage i bain sensibilisateur, til sølvbadet begynder at sværtes.

Processerne 5 og 6 kan gjentages, dersom virkningen er ufuldkommen.

7. Afskyllen i rigeligt vand, aftørren i filtrerpapir. Kanadabalsam.

Resultatet er sorte cilier, brune bakterier. Angives sikrere og mere ensartet i sin virkning end den Löfflerske methode.

Paavisning af bakteriekapsler.

Friedländer paaviser kapselen om pnevmobacillen saaledes:

1. Dækglaspræparater — lufttørrede og flammefixerede — lægges 1—2 min. i 1 pct. eddikesyre.
2. Eddikesyren afblæses af præparatet, som atter tørres i luften.
3. Farves et par sekunder i mættet anilinvand-gentianaviolet (s. 146).
4. Afvaskes i vand.
5. Undersøges i vand (i kanadabalsam bliver kapselen usynlig).

Kapslerne brede, blegt violette.

Johnes kapselfarvning ved miltbrand:

1. Dækglaspræparater — lufttørrede og flammefixerede — farves $1^1/_2$ min. under let opvarmning (direkte opvarmning med flamme under dækglasset) i 2 pct. vandig methylviolet.
2. Afvaskes i vand.

3. Affarves 6—10 sekunder i 2 pct. eddikesyre.
4. Afvaskes i vand.
5. Undersøges i vand.
Kapselen blegblaa eller ufarvet.

Kletts kapselfarvning:

1. Dækglaspræparater — som helst har ligget færdige et par timer — farves ved direkte ophedning over flamme med en draabe alkoholisk-vandig methylenblaatopl. (1 : 10 : 100).
2. Afvaskes i rigeligt vand.
3. Kontrafarves 5 sekunder i alkoholisk-vandig fuchsinopl. (1 : 10 : 100).
4. Afvaskes i vand.
5. Tørres, kanadabalsam.
Kjærner blaa, kapsler lyserøde.

Mugsop, hyphomyceter (aspergillus, mucor, penicillium), pathogene og ikke pathogene behøver i regelen ingen farvning for at erkjendes. I vævene kan de bringes tydeligere for øie ved tilsætning af 1—2 pct. kalilud, der destruerer vævet, eller de kan (i snit) farves ved Löfflers methylenblaat (s. 150) eller efter Gram (s. 147).

Favussoppen, achorion Schönleini, paavises i scutella eller i haar ved kogning af disse i 2 pct. kalilud og sønderpillen eller let fladtrykning (under dækglasset). Smukke farvede præparater faaes i scutella ved følgende behandling:

1. Fedtextraktion og hærdning i æther-alkohol (lige dele).
2. Indstøbning i celloidin.
3. Snit farves efter den Gram-Weigertske fibrinmethode (s. 147) eller med Waelsch eller Sahlis (s. 150) methylenblaat, affarves med 1 pct. HCl-anilin.
4. Undersøges i kanadabalsam.

Farvning af favussoppen i haar er derimod mindre let at udføre.

C. Boeck anvender til farvning af favus i hud, skjæl og scutella, til trichophyton tonsurans (herpes tons.), mikrosporon furfur (pityriasis versicolor) og mikrosporon minutissimum (erythrasma) som generel methode ifølge mundtlig meddelelse denne fremgangsmaade:

1. Hudskjællene lægges 1—2 min. i æther-abs. alkohol til udtrækning af fedtet.
2. Farves under let opvarmning $^1/_2$—$^1/_4$ minut i Sahlis methylenblaat.
3. Afvaskes i abs. alkohol.
4. Farven extraheres om fornødiges yderligere i tynd eddikesyreopl. (1 draabe iseddik i et stort uhrglas vand).
5. Abs. alkohol.
6. Xylol, kanadabalsam.

For favussop i selve haaret er heller ikke denne methode tilfredsstillende. I rodskeden derimod bliver soppen smukt farvet (Boeck).

---

b. Protozoer.

(I. Sarcodina. II. Flagellata. III. Infusoria. IV. Sporozoa.)

I. Sarcodina. Amöba coli — hyppig ved tyktarmkatarrher, stadig i syfilitiske excrementalabscesser — paavises direkte uden farvning. Denne er desuden vanskelig at udføre, giver kun en diffus protoplasmafarvning, ingen kjærnefarvning; i tilfælde benyttes gentianaviolet eller Löfflers methylenblaat.

II. Flagellata. Trichomonas vaginalis (i vaginalsekret), cercomonas intestinalis, megastoma entericum (i tarmkanalen og diarrhoiske tarmudtømmelser). Salomonsen anbefaler følgende undersøgelsesteknik: De livligt bevægelige dyr indfanges i haarrør, hvis indhold pustes ud paa objektglas som en liden draabe. Et dækglas forsynet i de 4 hjørner med fødder af meget blødt voks (voks 1 del, fedt 4 dele) lægges midt over draaben, dyret opsøges med svag forstørrelse, hvorpaa det fixeres ved at dækglasset forsigtig trykkes ned paa det uden at knuse det. Det kan fixeres ved $^1/_2$—$^1/_3$ pct. kromsyreopløsning tilsat dækglassets rand og kapillært trukket ind under det med filtrerpapir. Kromsyren udskylles derefter med vand, og farvning kan foretages med lithionkarmin, alt under dækglas. Undersøgelsen kan ogsaa foregaa, idet dyrene opsuges i fine kapillærrør af glas, som lægges i en vanddraabe paa objektglas og undersøges med vandimmersionslinse.

III. Infusorier. Balantidium coli undersøges som foregaaende.

IV. Sporozoer. De vigtigste heraf er det til hæmosporidierne hørende plasmodium malariæ, som findes i og udenfor de røde blodlegemer især hos noget anæmiske malariapatienter, der ikke behandles med kinin, helst kort før eller i begyndelsen af et feberanfald. Ved et naalestik paa et med vand og alkohol vel renset sted af øreflippen eller en finger erholdes en liden draabe blod, der straks opfanges paa et ganske rent objektglas og hurtig dækkes med et dækglas, saa den spreder sig i et meget tyndt lag. Omrandes med paraffin, voks eller lignende (s. 76), undersøges med 4—500

ganges forstørrelse. Extracorpusculære former bliver tydeligere, naar erytrocyterne ødelægges ved tilsætning af lidt vand.

Farvning af plasmodium malariæ udføres i dækglas-tørpræparater efter Ehrlich (s. 203 flg.) med eosin-methylenblaat:

1. De vel tørrede dækglas farves $^1/_2$ min. i mættet vandig eosinopl.
2. Afskylles i vand og tørres.
3. Farves $^1/_2$—1 min. i mættet vandig methylenblaat.
4. Afskylles i vand, tørres.
5. Kanadabalsam.

Tvivlsomme protozoer.

Molluscum-legemer (molluscum contagiosum) ansees dels for epithelmetamorfoser, af andre undersøgere for protozoer.

Touton isolerer dem ved 4 ugers maceration i fysiologisk saltvand. Bakterieudviklingen heri skader ikke

Salomonsen hærder i alkohol og farver fine snit med lithionkarmin eller en basisk anilinfarve.

C. Boeck anbefaler karbolsaffranin.

Bendas farvning af molluscum-legemer:

1. Fixering i 10 pct. salpetersyre.
2. Efterhærdning i 1 pct. kromsyre.
3. Farvning 24 timer i anilin-gentianaviolet (s. 147).
4. Differentiering 1 time i Grams iod-iodkalium (s. 149).
5. Efterfarvning i tynd vesuvin $^1/_2$ time.
6. Deshydrering i abs. alkohol, xylol, kanadabalsam.

Houg anvender som specifik moluscumfarvning følgende lidt omstændelige fremgangsmaade:

1. Fixation i iseddike-alkohol (1 : 100).
2. Afvaskning i vand.
3. Hærdning i alkohol.
4. Indstøbning i paraffin.
5. Farvning paa objektglas i

   Alkoholisk hæmatoxylinopl. 1 : 10
   Alunvand 1 : 300.

6. Affarvning i saltsyrealkohol.
7. Udvaskning 15 min. i vand.
8. Hurtig udvaskning i ammoniak-karmin.
9. Vandudvaskning, dernæst 10—15 min. vaskning i alkohol med 2 pct. myresyre.
10. Udvaskning med alkohol indeholdende lidt pikrinsyre 15 min.

Snittet er nu blaagrønt, viser let grønlige gregariner, rosenrødt væv, smukke blaa celler.

I cellerne hos forskjellige svulstarter, men særlig i carcinomer og sarkomer paavises til stadighed visse smaalegemer, der paa enkelte hold opfattes som snylteorganismer, enten af dyreriget (protozoer ɔ: gregariner eller coccidier) eller af planteriget (blastomyceter ɔ: gjærsop), medens de af andre antages at være degenerationsprodukter af celleprotoplasmaet og kjærnen.

Til undersøgelse af disse elementer fordres ganske friskt væv, vel hærdet i Flemmings vædske (s. 84), Heidenhains sublimat (s. 85) med paafølgende udvaskning i vand, efterhærdede i alkohol, paraffinindstøbning. De meget tynde snit, helst ikke over 5 μ, kan farves i hæmatoxylin-eosin, hæmatoxylin-saffranin, hæmatoxylin-saffranin-eosin-nigrosin. Ogsaa Biondi-Heidenhains farvning (s. 156) 24 timer har været anvendt.

Schwartz's saffranin-gentianaviolet-farvning anbefales som letvindt og godt differentierende generel methode:

1. Snit lægges 15 min. i
   vandig saffraninopl. 1 pct. — et uhrglas fuldt
   tilsættes med
   konc. alkoholisk gentianaviolet-anilinvand — 30 draaber.
2. Vaskes i 60—70 pct. alkohol, saalænge farvestof afgives.
3. Udtrækkes i 96 pct. alkohol til lysblaaviolet farve (stik i det røde tyder paa saffraninoverfarvning, i mørke præparater dækker overskud af det violette vævets detaljer).

I vellykkede præparater er celleprotoplasmaet let blaaligt, kromatinnættet i kjærnerne dybviolet, nucleolerne lyserøde).

Pianese fixerer og hærder meget smaa stykker af det ganske friske væv i 36 timer med

vandig	1	pct.	opl. af	klorplatin-natron	15 cc
»	0.25	»	» »	kromsyre	5 »
»	2	»	» »	osmiumsyre . .	5 »
reneste myresyre					1 draabe.

2. Udvaskes 12 timer i vand.
3. Indleires i paraffin.
4. Snittene deshydreres fuldstændigt og farves 24 timer i

Malachitgrønt	1.0 gr.
Syrefuchsin	0.4 »
Nigrosin	0.1 »
Dest. vand	50.0 »
Mættet alkoh. opl. af acet. cupr. .	50.0 »

heraf 20 draaber til 10 cc. vand.

5. Affarves i ½ pct. oxalsyreopl.
6. Indleires i xylolbalsam.

Cellekjærner blir grønne, protoplasma og bindevæv rosa, «kræftlegemer» i regelen røde.

Mikroskopisk undersøgelse af pathologiske sekreter o. lign.

Fordøielseskanalen.

1. Mund og svælg. Trøske (oidium lactis) paa tungeslimhinden (og svælget) undersøges, idet smaa partikler af det hvide belæg afskrabes og anbringes paa objektglas. Kan ogsaa farves som hyphomyceter med Löfflers methylenblaat, Gram.

Svælgbelæg og sekret udhentes med en liden vatdot paa en pinde; af det vedhængende belæg og slim forfærdiges, før nogen indtørring paa vatdotten kan finde sted, dækglaspræparater (eller objektglaspræparater), som farves med de almindelige bakteriefarver (Löfflers methylenblaat, Gram).

Propper i tonsillernes krypter udklemmes eller hentes med en Uchermanns sonde. Dæk-(eller objekt-)glaspræparater; undersøges paa mikroorganismer, inklusive difteri- og tuberkelbaciller, aktinomyces.

2. Maveindhold, optaget med mavepumpe eller opbrækket, underkastes mikroskopisk undersøgelse, dels for at kontrollere, hvilke spiserester der er tilstede samt det stadium af fordøielse, hvorpaa de befinder sig, dels til paavisning af pathologiske forekomster (blod, sarciner, gjærsop), i sjeldne tilfælde kan ogsaa dele af slimhinden (polyper eller svulstpartikler) forefindes.

For at differentiere mellem de forskjellige bestanddele af maveindholdet kan fordelagtig lidt iod-iodkaliumopl. (Gram) til-

sættes; herved blir stivelsepartikler blaa, muskelfibre gullige og sarciner glinsende gule.

Stykker af slimhindelignende udseende pilles først til foreløbig undersøgelse, blir dernæst hærdede, indstøbte og undersøgte i farvede snit (se arbeidsanordning s. 186).

3. Fæces underkastes kun forholdsvis sjeldent mikroskopisk undersøgelse; fornemmelig vil det da gjælde diarrhoiske udtømmelser.

For at dæmpe stanken bør udtømmelserne, naar de sættes bort for at sedimentere, dækkes med et lag af æther eller terpentin.

Af bundfaldet optages med pipette de partikler, som ønskes undersøgte. Man iagttager de forhaandenværende spiserester (muskelfibre, elastiske fibre, plantedele) og det stadium af fordøielse, hvorpaa de befinder sig. Krystaller af fosforsur ammoniakmagnesia, Charcot-Leydenske- og Cholesterinkrystaller.

Endvidere blodlegemer, gjerne stærkt forandrede, rundceller og slim (katarrher), mere eller mindre forandrede vævsdele (polyper, intussusceptioner). Parasiter (bændelormscolices og nye led, æg og embryoner af vermes, amøber, infusorier).

Tuberkelbaciller paavises forholdsvis let efter de beskrevne methoder, efter Lichtheim bedst uden kontrafarvning, hvorved tuberkelbacillerne let kan dækkes i den enorme bakterievrimmel.

Expektorat

Den makroskopiske undersøgelse af expektoratet bør altid gaa forud for den mikroskopiske.

Hensigtsmæssigst udheldes expektoratprøven paa en glasplade eller glastallerken; ved at anbringe denne paa afvekslende lyst eller mørkt underlag, vil de forskjellige dele af expektoratet

tegne sig skarpt. Man kan ogsaa bruge en porcellænstallerken, som til hælvten er mørkt emaljeret.

Til mikroskopisk undersøgelse udvælges et lidet kvantum af de opake (graalige eller grønne) partier, hvilket «udklippes» med en ikke for grov pincet, udbredes paa objektglas og dækkes med dækglas — uden tryk; om fornødiges, efter udbredning med naale.

Ved undersøgelsen skaffer man sig rede paa de tilstedeværende celleformer (pladeepithel, flimmerepithel, «lungeepithel», rundceller, blodlegemer) samt disses tilstand (frisk eller degenereret, kornet), pigment (kul- og blodpigmenter), krystaller (Charcot-Leydenske asthmakrystaller, cholesterim, fedtsyrenaale), Curschmanns asthmaspiraler, eller lungepartikler, specielt elastiske fibre. Disse erkjendes paa deres stærke lysbrydning, dobbelte konturering og deres evne til at modstaa opvarmning med kalilud. Bevisende for lungedestruktion er de elastiske fibre kun, naar man finder dem alveolært anordnede.

Rigeligst og sikrest findes de elastiske fibre i graalige, tørt udseende grynstore klumper («linser»), som forekommer spredt i expektoratet.

En nøiagtigere undersøgelse paa elastiske fibre udføres saaledes:

Omtrent 10—15 cc af expektoratet tilsættes lige meget 10 pct. kalilud og koges dermed, til det hele opløses til en ensartet seig masse. Der blandes med det 4—5-dobbelte volum vand, og af det i 24 timer sedimenterede eller 5—10 min. centrifugerede bundfald optages med pipette prøver til undersøgelse. Ved centrifugeringen bør det hele vædskekvantum komme under bearbeidelse.

Undersøgelse af mikrober i expektorat.

Smaa dele af expektoratet, især dettes purulente (grønne eller graa, opake) partier anbringes paa et dækglas, et andet presses derimod, og de to dækglas trækkes forsigtigt fra hverandre, saa at begge paa deres ene side bliver overtrukket af

et ganske tyndt expektoratlag. Efter lufttørring og flammefixering farves det med Löfflers methylenblaat eller en anden af de basiske anilinfarver (fuchsin, methylviolet osv.).

Undersøgelse af tuberkelbaciller i expektorat.

Materialet tages i expektoratets opake, grønne eller graa, purulente partier eller ogsaa i de graahvidlige smaa klumper, «linser», som ofte kan levere fuldstændige renkulturer af tuberkelbaciller; rester af brød og andre melspiser kan dog have stor lighed dermed, og for mindre øvede er det hensigtsmæssigst at holde sig til de grønne partier. Som regel vil tuberkelbacillerne findes i det purulente sekret, men leilighedsvis kan ogsaa de ganske klare, slimede partier af expektorat indeholde endog store masser deraf. I stærkere blodfarvede partier af expektorat vil man kun undtagelsesvis finde tuberkelbaciller. — Dækglaspræparater, forfærdigede som beskrevet ved mikrobeundersøgelse, lufttørrede og flammefixerede, farves paa tuberkelbaciller paa en af de side 97 o. flg. beskrevne methoder. Undersøges i vand, eller efter tørring i kanadabalsam.

Ikke sjelden er tuberkelbacillerne saa faatallige og spredte, at de unddrager sig paavisning paa ovennævnte vis.

Man samler da større masser deraf ved sedimentering (centrifugeren), efterat expektoratets slimede konsistens først er gjort mere flydende.

Biederts sedimenteringsmethode ved paavisning af tuberkelbaciller i expektorat: Ca. 15 cc expektorat tilsættes med 30 cc tynd kalilud og koges under stadig omrøren, til det er ganske tyndtflydende. Der tilsættes da 150 cc vand (eller Wendriners vædske, hvis sedimenteringen skal ske ved henstand, s. 250), blandingen opkoges paany og hensættes 2—3 dage til sedimentering. (Kan ogsaa centrifugeres, men for hver centrifugeret portion bortheldes den klare vædske, og en ny portion heldes paa det erholdte sediment, indtil den hele portion er bearbeidet).

Naar sedimenteringen (centrifugeringen) er færdig, bortheldes den klare vædske, bundfaldet omrøres og udbredes draabevis i tynde lag paa 6—8 dækglas. Dækglaspræparater, tuberkelbacillefarvning paa langsom vis (koldt i 24 timer) (s. 234).

Van Ketels methode undgaar kalitilsætningen. I et cylinderglas fyldes 10—15 cc expektorat, 10 cc vand, 6 c acid. carbol. liqvefact., hvorpaa fyldes til 100 cc vand, og det hele rystes dygtigt et godt minut. Sedimentering 24 timer af bundfaldet, der ophentes med pipette; dækglaspræparater farves med karbolfuchsin (s. 235).

Strohschein sedimenterer expektoratet efter at have rystet det med 1 del Wendriners vædske (se nedenfor) og 2 dele vand (sedimenterer 24—48 timer) og undersøger bundfaldet tyndt udbredt i dækglaspræparater.

M. Dahmen koger et halvt reagensglas fuldt af expektorat paa vandbad i 15 min., hvorved æghvidestoffene koagulerer og bundfældes, idet de river bacillerne med sig. Den ovenfor staaende tynde vædske afheldes, og bundfaldet undersøges i dækglaspræparater. Methoden har den fordel, at den undgaar alle kemikalier, medens kogningen ikke væsentlig nedsætter tuberkelbacillernes farveevne.

Urinbundfald

(epithel fra nyrerne, urinveien eller ydre genitalia, rundceller, røde blodlegemer, krystaller, urincylindre, spermatozoer, mikroorganismer).

Før den mikroskopiske undersøgelse paabegyndes, bør man have taget rede paa urinens almindelige kemiske og fysiske egenskaber.

I tilfælde af, at sedimenteringen foregaar langsomt, eller man nødes til at opbevare urinen nogen tid, før undersøgelsen kan finde sted, saa at man kan befrygte forraadnelse, tilsættes urinen med saa meget 2—3 pct. karbolsyre, at vædsken i det hele indeholder 1 pct. deraf; eller man kan ryste urinen med kloroformvand.

Ved mikroskopisk, særlig bakteriologisk undersøgelse af æghvideholdige uriner er en tilsætning af borsyre — ca. 2 pct. af den hele vædskemængde — et godt middel til at konservere de morfologiske bestanddele; desuden hindres derved videre udvikling af mikroorganismer, urinsyre og uræter holdes i opløsning, hvorhos ogsaa slim opløses og fortyndes.

For at undgaa en altfor stor fortynding anvendes gjerne boraxborsyreopløsninger (polyborater), bedst i form af Wendriners vædske.

Denne tillaves saaledes:

Bibor. natr. . 800.0
opløses under opvarmning i
Vand 1000.0

Derpaa tilsættes i den endnu varme vædske:

Borsyre 120.0
Bibor. natr. . 40.0

Efter afkjølingen frafiltreres de udskilte krystaller.

Af denne vædske tilsættes $^1/_3$—$^1/_5$ af urinens volum, hvorefter der blandes godt.

Ved anvendelse af centrifuge (s. 75) indvindes betydelig tid.

Det sedimenterede eller centrifugerede bundfald ophentes med pipette og fordeles paa et antal objektglas (s. 74). Skulde sedimentet vise sig at være ubetydeligt, bør man paa forhaand have anbragt en liden draabe tynd iod-iodkalium (fortyndet Gram's opl.) paa objektglasset, de morfologiske bestanddele i urinen (celler, cylindre) vil da optage den gule farve og træde stærkere frem.

Det bør erindres, at bundfaldet ordner sig nogenlunde efter bestanddelenes specifike vægt, saaledes at krystallinske bestanddele kommer dybest, dernæst røde blodlegemer, enkelte mikroorganismer, specielt tuberkelbaciller og øverst forskjellige cellulære elementer.

Urinsedimenter opbevares til senere brug efter Gumbrecht saaledes:

1. Centrifugeres (sedimenteres).
2. Den over sedimentet staaende vædske afheldes (hvis urinen indeholder megen albumin, udvaskes bundfaldet ved rystning med 0.6 pct. saltvand, centrifugeres paany, saltvandet afheldes).
3. Bundfaldet fixeres ved rystning med 2—10 pct. formol, kan opbevares heri. (Ved blodholdig urin fixeres bundfaldet i 5 pct. sublimat før formoltilsætningen. Sublimatet afheldes efter centrifugeringen og fjernes ganske ved gjentagen udskylling med vand og centrifugeren, før formol tilsættes.)

Dækglaspræparter til opbevaring af urinbundfald:

1. Urinen centrifugeres (sedimenteres).
2. Vædsken afheldes, bundfaldet vaskes ved rystning med vand, centrifugeres paany.

3. Af det saaledes vaskede bundfald gjøres almindelige dækglastørpræparater (lufttørring, flammefixering).

Bundfaldet udbredes tyndt og i jevnt lag over dækglasset. Er det for tæt og rigeligt, fortyndes det med vand.

Vaskningen af bundfaldet udføres for at undgaa senere generende udfældning af urinens salte.

4. Farvning i Löfflers methylenblaat.
5. Afskylling, tørring. Kanadabalsam.

Ogsaa de fleste af urinens mikroorganismer farves hermed.

Farvning af tuberkelbaciller i urin. Tuberkelbacillerne paavises næsten udelukkende kun i sur urin.

1. Det centrifugerede (sedimenterede) bundfald vaskes, og dækglaspræparater forfærdiges som beskrevet straks ovenfor punkt 1. 2. 3.

Ved undersøgelse paa tuberkelbaciller bør et større antal (8—10) dækglaspræparater gjøres færdige med en gang.

2. Farves 24 timer i karbolfuchsin (ved den hurtige farvning under opvarmning kan den tynde hinde af bundfaldet paa dækglasset let afløses og gaa tabt).
3. Affarvning i HCl-alkohol, vaskning i 70 pct. alkohol, kontrafarvning i Löfflers methylenblaat (s. 150).
4. Undersøges i vand — eller tørres, kanadabalsam.

Præparaterne maa gjennemgaaes meget nøie, da tuberkelbacillerne i regelen er faatallige, om end gjerne samlede i større grupper, hvor de findes.

Urethralsekret opfanges direkte paa objekt- eller dækglas, undersøges fornemmelig paa celleformer (epithel, rundceller, blodlegemer og spermatozoer) samt paa mikroorganismer (gonokokker, flere arter baciller).

Urethralpus undersøges paa mikroorganismer i dækglas- (eller objektglas-)tørpræparater. Et tyndt lag af sekretet bredes paa glasset, lufttørres og flammefixeres (kan da opbevares længere tid før undersøgelsen), farves i methylenblaat eller tynd vandig fuchsin. Gonokokker se s. 234.

Sperma (indtørret paa linned, papir o. lign.) undersøges efter Ungars methode (s. 144).

Vaginalsekret behandles som urethralsekret (epithel, rundceller, blodlegemer, bakterier, protozoer).

Blod.

Blodets normale korpuskulære elementer (røde blodlegemer, levkocyter, blodplader) undersøges som beskrevet s. 201 flg. Undersøgelsen kan dels foregaa i flydende præparat og da gjerne fortyndet og fixeret med Hayems eller Pacinis vædske (s. 86) eller paa dækglas-tørpræparat (s. 203).

Blodparasiter. Undersøgelser paa Laverans plasmodium malariæ udføres som beskrevet s. 243, miltbrand ved farvning af tørpræparat med Löfflers methylenblaat eller Grams farvning, recurrensspirillen (spirochæti Obermeyeri) efter Günthers methode (s. 237), svingtraadfarvning 1, tuberkelbaciller i blodet acut almindelig miliærtuberkulose paavises paa vanlig maade (s. 243) i tørpræparater paa dækglas.

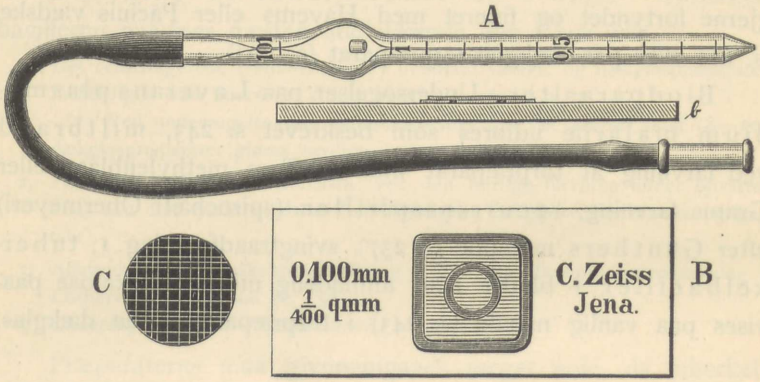
Tælling af røde blodlegemer

udføres hensigtsmæssigst med Thoma-Zeiss' blodtællingsapparat. Dette bestaar af en kapillarpipette og et tællekammer. Pipetten (Fig. 74 A) er ca. 12 cm. lang og viser paa sin nederste halvdel en inddeling betegnet med 0.5 og 1.0; straks ovenfor det sidste mærke udvider kapillærrøret sig til en omtrent nødstor blære, i hvilken der findes en frit bevægelig glaskugle, og det sted, hvor glasblæren atter snevrer sig sammen til kapillærrør, betegnes med 101.

Tællekammeret (B) bestaar af et stort og tykt objektglas, paa hvis midte der er fæstet en tynd cirkelrund glasplade, hvis overflade er forsynet med en kvadratisk inddeling, hvor linserne ligger nøiagtig $^1/_{20}$ mm. fra hinanden (C). Hver gruppe paa 16 kvadrater er til bedre orientering begrænset af dobbeltlinier.

Som en ramme udenom denne inddelte glasplade og adskilt fra den ved et aabent rum paa ca. 1.5 mm. er paa objektglasset klæbet en anden glasplade, der nøiagtig er 0.1 mm. tykkere end den første; naar et fuldstændig planslebet dækglas lægges paa den ydre ramme, vil der altsaa mellem det inddelte glas i midten og dækglassets underflade være et kammer paa 0.1 mm. dybde, og det rum, der ligger mellem glassene over hver af de smaa firkanter, bliver saaledes: $\frac{1}{20} \cdot \frac{1}{20} \cdot \frac{1}{10} = \frac{1}{4000}$.

Fig. 74.



Tællingen foretages saaledes: en finger eller en ørelap vaskes omhyggelig med sæbe og vand, aftørres med alkohol og tilslut med æther. Med en skarp liden lancet eller til nød med en naal stikkes hul paa huden, saa blodet villigt flyder ud. Draaben opsuges straks i kapillærpipetten nøiagtig til mærke 1 (ingen luftblærer i kapillærrøret), pipettens spids aftørres hurtigt, hvorefter pipetten fyldes til mærke 101 ved opsugning af en blandingsvædske, som staar færdig i en liden skaal. Som blandingsvædske benyttes enten en 3 pct. klornatriumopløsning, en 5 pct. svovlsur natronopl., eller ogsaa Hayems eller Pacinis vædske (s. 86). Dahland og v. Jaksch anbefaler særligt en $2^1/_2$ pct. opl. af dobbelt kromsur kali.

Blodet og vædsken sammenblandes nu grundigt ved hurtigt at dreie pipetten mellem fingrene, saa at den lille glaskugle

ruller rundt i vædsken. Ved at blæse lidt i pipettens øverste ende eller i den her fæstede gummislange fjerner man den lille draabe ublandet vædske, der er bleven tilbage i kapillæret.

En draaabe af blodblandingen blæses forsigtigt ned paa den inddelte tælleplade og dækkes med det til apparatet hørende planslebne dækglas, der bør presses saa fast mod den underliggende glasramme, at Newtonske farveringe opstaar. Draaben gjøres ved nogen øvelse netop saa stor, at den fylder overfladen af den runde tælleplade uden at rinde udenfor i mellemrummet, hvilket gjør præparatet ubrugeligt. — Luftblærer maa ikke findes, og blodlegemerne maa være jevnt fordelte, hvilket paa forhaand undersøges med svag forstørrelse. Efter et par minuters henstand har blodlegemerne sænket sig i vædsken og ligger nu paa kammerets bund færdige til tælling.

Med almindelig arbeidsforstørrelse (2—300 gange) tælles nu blodlegemerne i en for en af de smaa kvadrater. Man tæller i en vis orden, begynder opad tilvenstre, regner til samme kvadrat de paa sammes høire og nederste begrænsningslinie liggende blodlegemer, medens de opad og til venstre liggende ikke tælles med. Naar de første 16 smaa kvadrater ɔ: et stort kvadrat er gjennemtællet, opsummeres resultatet, og et nyt stort kvadrat tages i arbeide, indtil ca. 1200 blodlegemer eller 6 store kvadrater er talte.

Beregningen udføres saaledes:

Lad summen af fundne blodlegemer være 1260, i 96 smaa ruder; i hver rude findes da gjennemsnitlig $\frac{1260}{96} = 13.1$ blodlegemer. Da hver rude repræsenterer $\frac{1}{4000}$ cmm., og fortyndingen er 100 gange, vil antallet af blodlegemer pr. kubikmillimeter blive

$$13.1 \times 4000 \times 100 = 5240000$$

Efter tællingen maa kapillærpipetten grundigt renses, idet den først suges fuld af vand, dernæst af abs. alkohol og endelig af æther, som forjages ved kraftig blæsen. I tilfælde af at kapillæret stoppes af koagler, maa disse forsigtigt fjernes med en meget fin metaltraad, hvorefter glasset først udskylles med tynd kalilud, derpaa med vand, alkohol, æther.

Ogsaa tællekammeret maa holdes godt rent.

Tælling af hvide blodlegemer

foregaar paa en noget lignende maade som ved de foregaaende (Thoma), kun at der her benyttes en maalepipette, som er konstrueret til at give fortyndinger paa $^1/_{10}$ eller $^1/_{20}$. Til fortyndingen bruges en $^1/_3$ pct. eddikesyre, hvorved de røde blodlegemer opløses, saa kun levkocyterne bliver tilbage. Paa grund af levkocyternes faatallighed maa et saa meget større areal af præparatet undersøges. Thoma tilraader at bruge det hele synsfelt som maaleenhed, idet man ved indstilling af tubus faar synsfeltets diameter til at svare til et helt tal af tællekammerets inddelinger. Er diameteren saaledes 10 ruder, hver af $^1/_{20}$ mm.s bredde, eller $^{10}/_{20}$ mm., saa bliver radien $= \frac{10}{40}$ og cirkelfladen $= \pi \left(\frac{10}{40}\right)^2$ mm.; med 0.1 mm. dybde indeholder kammeret i synsfeltets udstrækning $0.1 \times \pi \times \left(\frac{10}{40}\right)^2 mm^3$. Man tæller 16 hele synsfelt, hvilket i regelen er nok, og finder deraf antallet af levkocyter pr. mm.^{3} ved følgende proportion, idet

Z = det samlede antal talte celler

Q = det samlede kubikmaal af de undersøgte synsfelter $16 \times \left(0.10 \times \left(\frac{10}{40}\right)^2 \pi\right) =$

10 = fortyndingen af blodet

$\frac{10\,Z}{Q} = x =$ antallet af hvide blodlegemer pr. kubikmillimeter.

Praktisk talt udføres regningen, naar alle de i ovenstaaende exempel nævnte forudsætninger med hensyn til fortynding af blodet, synsfeltdiameternes størrelse og antal undersøgte synsfelter iagttages, ved at dividere det fundne tal med 3.14 og multiplicere med 10 000, altsaa $\frac{10\,000\,Z}{3.14}$.

v. Jaksch tæller det hele rudede felt i tællingscellen altsaa 400 ruder ɔ: $\frac{400}{4000}$ eller $\frac{1}{10}$ mm.^{3}. Det fundne antal hvide blodlegemer multipliceret med 100 (ved 10 ganges fortynding) eller 20 (ved 20 ganges fortynding) giver direkte antallet af hvide blodlegemer pr. kubikmillimeter.

Maaling af røde blodlegemer.

Diametermaaling kan foretages enten i flydende substrat eller paa tørpræparater. Gram anbefaler følgende af Buntzen oprindelig angivne methode: blodet opsuges kapillært i et ca. 9 cm. lang og $^1/_4$—$^1/_2$ mm. vidt glasrør, som øieblikkelig tillukkes i begge ender med en lakdraabe. Glasset gives endel smaa stød, hvorved serum udskilles; efter 5—8 timer brækkes røret over paa grænsen mellem serum og koagel, og serumdraaben blæses hurtigt ud i tællingscellen paa et Thoma-Zeiss blodlegeme-tælleapparat; cellen lukkes med dækglas, der er fugtet langs underste rand for at undgaa fordampning af serumdraaben. Selve maalingen udføres med okularmikrometer, hvis delingsværdier er nøiagtig udprøvet for det benyttede objektiv, okular og tubuslængde (s. 56).

Laache foretrækker tørpræparater saaledes fremstillede: et opvarmet objektglas trækkes hurtigt over den frisk fremtrædende bloddraabe, saa at blodet danner et tyndt og hurtigt tørrende overtræk paa glasset. Heri beholder blodlegemerne sin form i lange tider og maales som vanligt med okularmikrometer.

Maaling af de røde blodlegemers tykkelse er lettest, hvor de ligger i pengerulleform (ufortyndet blod). Man maaler længden af en rul og finder de enkelte blodlegemers gjennemsnitstvermaal ved at dividere med deres antal (Gram).

Undersøgelse af faste objekter, pathologiske vævs- og organsdele eller svulster osv.

foregaar efter samme principer som for normale præparater beskrevet, (udpillen, hærdning, indstøbning, snit, farvning osv., se arbeidsanordningen s. 186).

Imidlertid er der ved undersøgelse af pathologiske gjenstande visse hensyn at tage, som ikke gjør sig gjældende ved normale undersøgelser.

Gjenstanden underkastes først en nøiagtig makroskopisk undersøgelse for at skaffe besked om dens udseende, farve, haardhed osv.; denne undersøgelse maa foretages med varsomhed, for at ikke for haarde tryk eller for megen fingereren skal forstyrre finere histologiske forhold.

Det rigtige valg af de til mikroskopisk undersøgelse udtagne stykker er ogsaa af megen vigtighed. Man bør hertil ikke blot tage saadanne partier af gjenstanden, som viser den pathologiske proces i sin fulde udvikling, men ogsaa fra steder, hvor den netop er begyndt; ved svulster er det saaledes ofte meget hensigtsmæssigt at underkaste randpartierne nøiere granskning, saa man i samme præparat kan finde saavel friskt som pathologisk væv.

Hvor objektet er af vekslende udseende og konsistens, bør stykker fra disse forskjellige steder udvælges.

Ofte kan pillepræparater af det helt friske præparat give god veiledning. Særlig kan et pillepræparat af svulster (carci-

nomtapper, sarkomer) give en mere korrekt oplysning om cellernes virkelige form og udseende, end man faar af de kjærnefarvede snitpræparater.

I visse tilfælde kan man med en dobbeltkniv fremstille snit af friskt væv til foreløbig orientering eller til undersøgelse paa bakteriecenkoli med kalilud, der destruerer vævet og kun lader mikroberne (samt elastiske fibre o. l.) tilbage. Dobbeltkniven bestaar af 2 krumeggede skalpelblade, der er stillede parallele, og hvis afstand kan indstilles efter behovet ved hjælp af 2 skruer. Med et raskt snit gjennem gjenstanden udskjæres en tynd skive af denne. Dog er denne undersøgelse temmelig primitiv.

Ønsker man hurtigt at komme til et resultat, kan man forfærdige frysesnit med mikrotomen (s. 96, 107, 108).

Ved nøiagtigere undersøgelse af pathologiske gjenstande bør man straks udtage et vist antal stykker for at kunne anvende forskjellige fixerings- og hærdningsmidler (alkohol, Müllers vædske, sublimat osv.), ligesom man af hvert præparat skjærer et rigeligt antal snit for at holde sig adgangen aaben til den størst mulige variation i farvningen og den øvrige behandling.

Den mikroskopiske undersøgelse bør lægge den største vægt paa en nøiagtig bestemmelse af de enkelte celleformer og vævsdele. Kun herved kan en tilforladelig mening om den pathologiske proces's egentlige natur blive opgjort. Hvor den sygelige udvikling har foranlediget en altfor stor forandring i cellernes og vævsdelenes udseende, bør man om muligt søge at forfølge saadanne partier skridtvis tilbage til den normale typus.

Hvor undersøgelsesobjektet bestaar af talrige mindre stykker, saaledes f. eks. ved uterinudskrabninger, er det hensigtsmæssigt efter den sædvanlige hærdning, deshydrering og gjennemtrængning med celloidin at indstøbe et større antal af smaastykkerne samtidig paa en og samme træklods (kork, stabilit). Man anbringer stykkerne saaledes, at snittene vil falde saavel lodret paa som parallelt med overfladen, saa at man i samme

mikroskopiske præparat kan have gjennemsnit i flere retninger til undersøgelse.

Ved tilstedeværelse af større blodmængder (koaguleret eller flydende), der dels vil overdække de egentlige vævsdele, dels efter hærdning og indstøbning med disse vil besværliggjøre undersøgelsen, er det hensigtsmæssigt før hærdningen at udvaske i rigeligt saltvand 0.6 pct. den hele til undersøgelse udtagne masse, hvorved blodet opløses og fjernes.

Under indstøbningen bør man altid sørge for at være fuldt orienteret med hensyn til stykkets stilling, saa at snittet senere kan lægges i det plan, der giver de bedste oplysninger om objektets beskaffenhed.

Med hensyn til hærdnings- og farvningsmethoder bør i regelen saadanne vælges, der passer for normale organer og vævsdele, uden for saa vidt særlige pathologiske tilstande (specielt degenerative) skulde udkræve særlige methoder.

Mikroskopiske reaktioner paa degenerationstilstande.

Kornet albuminøs degeneration.

Celler, udskrabet vævssaft, pillepræparater, dobbeltknivsnit eller frysesnit af friskt væv undersøges først i saltvand, derpaa i 1—3 pct. eddikesyre eller 1—2 pct. kalilud; albuminøse korn svinder heri, saa snittet bliver klarere; de paavirkes derimod ikke af alkohol, æther eller kloroform.

Fedtdegeneration. Fedtinfiltration.

Friske eller ogsaa i formol eller Müllers vædske hærdede præparater pilles eller skjæres (frysemikrotom). Alkoholhærdning eller indstøbninger, hvor til deshydrering anvendes æther og alkohol, maa undgaaes, da fedtet derved opløses og udvaskes.

I pillepræparaterne eller snittene sees de stærkt lysbrydende fedtkorn mørke ved gjennemfaldende lys, hvide ved paafaldende. De paavirkes ikke af eddikesyre og kalilud, men opløses i alkohol, æther og kloroform (modsat albuminøse korn). Ved prøven med æther og kloroform maa vandet i præparatet og under dækglasset først fjernes ved udskyllen med rigelig alkohol. Dækglasset bør løftes lidt, for at alkoholen (æther og kloroform) kan naa præparatet overalt.

Osmiumsyrefarvning (sværtning) af fedtkorn erholdes i friskt væv ved at lægge ganske smaa stykker eller snit heraf fra et par til 24 timer i $^1/_2$—1 pct. osmiumsyre, bedst i mørke, derpaa udvaske grundigt i rindende vand og undersøge i glycerin, sol. acetat. kal. 50 pct., eller xylolkanadabalsam (terpentin maa undgaaes) se s. 171.

Fedt og fedtkorn farves ogsaa ved hærdning i Flemmings vædske (s. 84) i 12—24 timer, eller i Marchis vædske (s. 172) ca. 8 dage, sidstnævnte væsentlig egnet for myelinfarvning i centralnervesystemet.

Sværtning med $\overline{Os}$ lykkes ogsaa i præparater, der paa forhaand har været i formol eller Müllers vædske, som forøvrigt bør udvaskes godt i vand, før $\overline{Os}$ indvirker. Efter farvningen i $\overline{Os}$ bør stykkerne ligeledes udvaskes godt, og snittene eller udpillede smaastykker kan da kjærnefarves. Karmin eller hæmatoxylin.

Slimdegeneration.

Slimholdige præparater fixeres og hærdes i Müllers vædske. Alkohol bør ikke anvendes, da slimet derved koagulerer, og vævet skrumper.

Da mucinet i legemet neppe overalt er identisk, men kemisk forskjelligt efter de forskjellige kilder, hvorfra det stammer, lader det sig let forklare, at dets farveevne er vekslende og de anvendte farvemethoder af usikker virkning i de enkelte tilfælde.

I friske præparater (pillepræparater, frysesnit) sees slimet at svelle op i vand, koagulerer ved tilsætning af stærk eddikesyre eller alkohol til kornede striber.

I snit anvendes forskjellige farvemethoder:

Hæmatoxylin (ikke sur, lidet alunholdig) giver slimet en kraftigere blaa farve end protoplasma.

Som særlig egnet for slimfarvning angiver P. Mayer følgende muchæmateïn:

Hæmateïn	0.2
udrives i nogle draaber glycerin	
Kloraluminium . .	0.1
Glycerin	40.0
Vand	60.0

Snit farves heri 10—15 min. Udvaskes i vand.

I den sidste tid anbefaler Rawitz sin glycerinalunhæmateïn til slimfarvning:

Hæmateïn	0.5
Aluminium-ammoniumsulfat .	3.0
Aqvæ destill.	100.0
Adde: Glycerini	100.0

Specielt bliver slimfarvningen distinkt, naar farven fortyndes til en tynd blaalig vædske, og præparatet lades 24 timer heri.

Paa samme maade anvendes mucikarmin (s. 127).

Ved vesuvin antager mucin en stærkt mørkbrun farve, hvorved den sondrer sig godt fra det lysebrune protoplasma (s. 143). Endvidere benyttes saffranin (s. 149) i stærk vandig eller vandig-alkoholisk opløsning.

Sikkert farver efter P. Mayer saffranin i mættet opløsning i 30 pct. alkohol i 10—12 timer med efterfølgende udvaskning i sur alkohol. Slimet viser sig da smudsig violet.

Toluidinblaat og thionin se s. 153.

Unna benytter polychromt methylenblaat til mucinfarvning i slimkjærtler paa følgende maade:

1. Hærdning i alkohol.
2. Snit farves 1 minut i polychromt methylenblaat.
3. Afvaskes i sur alkohol.
4. Fixeres $^1/_2$ minut i 10 pct. bikrom. kali-opl.
5. Affarves hurtigt i abs. alkohol.
6. Bergamotolje, kanadabalsam. Mucinen er rød.

Süssdorf farver slim i kjærtler saaledes:

1. Frisk kjærtel eller slimhinde hærdes i:
   a. Alkohol eller
   b. 1 pct. osmiumsyre eller
   c. Flemmings vædske.
2. Udvaskes i vand efter hærdning i b og c.
3. Indleires i paraffin, skjæres.
4. Efter at paraffinen er fjernet, farves snittene paa objektglas 1—2 min. i 1 pct. vandig methylenblaat.
5. Affarves i saltsyrealkohol, til ingen farveskyer mere afgives, udvaskes i 70 pct. alkohol.
6. Kontrafarves i boraxkarmin. Slimsubstansen bliver blaa, de øvrige partier røde.

Colloiddegeneration.

Normalt findes colloidsubstans i gl. thyroidea, hypofysen, prostata hos gamle folk, nyrekanalerne under visse nyresygdomme; den sveller ikke i vand, og udfældes ikke af alkohol eller eddikesyre — i modsætning til mucin.

Colloidsubstans i snit (foregaaende hærdning i alkohol eller Müllers vædske) farves i et eller andet hæmatoxylin med kontrafarvning i van Gieson; eller ogsaa kjærnefarvning i karmin (lithionkarmin), kontrafarvning i pikrin-indigokarmin. Begge methoder giver skarpe billeder. Ligeledes Israëls orceïnfarvning (s. 139).

Hyalindegeneration.

Hyalint degenererede vævsdele, f. eks. karvæg i angiodystrofiske ovarialarterier, farves sterkt i karmin, pikrokarmin, eosin, syrefuchsin og andre syrefaste farver. Ved van Giesons farve (s. 155) antager hyalinen en speciel glinsende rød farve.

Amyloid degeneration (afleiring).

Amyloid substans farves tydeligst paa friske præparater, men ogsaa paa saadanne, som er hærdede i alkohol eller Müllers vædske.

De fornemste methoder er farvninger med iod (svovlsyre), samt med methylviolet eller dermed nærstaaende anilinfarver.

Iodfarvning.

1. Snit af friskt materiale farves nogle minuter i en iod-iodkaliumopløsning (Grams iodopl., eller fortyndet Lugols vædske. (Snit af hærdet væv udvaskes bedst paa forhaand 5—10 min. i vand).
2. Udvaskes i vand.
3. Undersøges i glycerin.

Den amyloide substans bliver dyb brunrød, det sunde væv lyst brungult. Farven blegner efterhaanden, men holder sig bedre, naar præparatet indleires i mucil. gi. arab. tilsat med lidt glycerin. Varige samlingspræparater fremstilles efter Langhans ved at deshydrere i abs. alkohol tilsat 20 pct. iodtinktur og opbevare i origanumolje (v. Kahlden).

Iodsvovlsyrefarvning.

Efter iodfarvningen af snittene udvaskes disse i tynd svovlsyre, hvorved den amyloide substans antager en violet-blaa eller grønlig farve.

Galeotti anbefaler som en meget ømfindtlig iodreaktion paa amyloid følgende:

1. Snit (celloidinsnit) farves $^1/_4$—$^1/_2$ time i en 5 pct. iodkaliumopl.
2. Affarves hurtigt i vand.
3. Skylles et par minuter i klorvand (Merks klorvand + vand ana).

4. Udvaskes i vand.
5. Opbevares i glycerin.

Kun amyloidsubstansen farves i det ved klorvirkningen afspaltede iod.

Methylvioletfarvning af amyloid substans. Se s. 146. Ogsaa methylgrønt, iodgrønt giver lignende reaktion, angivelig da disse farvestoffe indeholder smaa mængder methylviolet. Methylvioletfarvningen kan kombineres med en forfarvning af vævet med 2 pct. alkoholisk-vandig vesuvin (Birch-Hirschfeld) eller efter efterfarvning med van Giesons farve, hvad der letter oversigten over den amyloide substans's lokalisation. Ogsaa en almindelig farvning med hæmatoxylin-eosin er meget vel tjenlig til sidstnævnte formaal.

Corpora amylacea (i centralnervesystemet, prostata, lungen) farves ogsaa som amyloid substans.

Kantorowitz's amyloidfarvning for balsampræparater:

1. Præparatet hærdes i alkohol eller sublimat.
2. Indstøbes i celloidin.
3. Snit farves ca. 5 min. — men uden skade i flere timer — i vandig mættet thioninopl. I tyndere opløsning tiltrænges altid adskillige timer til farvningen.
4. Udskylles i vand.
5. Lægges paa objektglas, tørres her med filtrerpapir.
6. Deshydreres enten i

   Anilinxylol (2 : 1)
   eller i
   Karbolxylol (1 : 3).

7. Skylles i xylol.
8. Damarfernis.

Glycogen. (Normalt i lever, nyrer, brusk, særlig øget ved diabetes.). Stykker hærdede i alkohol (ikke behandlede med vand eller vandige opløsninger, der udvasker glycogenet) farves og opbevares i en tyk gummiopløsning tilsat lidt Lugols vædske (s. 263).

Kalkdegeneration (kalkafsætning).

Kalkafsætninger angribes ikke af alkohol-æther, men opløses af saltsyre, modsat fedt, hvormed der kan være en vis lighed. Kulsur kalk viser ved syretilsætning dannelse af gasblærer.

Reagenserne tilsættes under dækglasset. Tilsættes svovlsyre, fremkommer gipskrystaller.

I snit bliver ved farvning med hæmatoxylin kalkpartiklerne røde, medens vævet forøvrigt er blaat; ved farvning med alun-kochenille (s. 125) bliver kalken dyb rød, og ved overskud af svovlsyre i kochenillen kan man samtidig ogsaa faa udfældt gips. Gammel alun-kochenille er saaledes et godt reagens paa kalk.

Blødninger i vævet, blodpigment (jernholdigt), **hæmosiderin**

kan paavises ved svovlammonium eller ved ferrocyankalium + saltsyre (Perls reaktion). For begge mikrokemiske reaktioner har Qvincke angivet methodiske fremgangsmaader:

Hæmosiderinfarvning med svovlammonium.

1. Organstykker eller snit af alkoholhærdede præparater — friske og Müller-hærdede mindre lette at farve — lægges fra nogle minuter til $^1/_2$—1 time eller mere i ren eller 10 pct. svovlammonium, indtil farvning er indtraadt. Stærk opløsning af svovlammonium eller tilsætning af lidt NH_3 paaskynder farvningen. Snit hærdede i Müllers vædske behøver flere dages farvning i svovlammonium.
2. Snittene udvaskes hurtigt i vand; ikke for længe.
3. Undersøges i glycerin (der ikke er surstofholdig og saaledes heller ikke oxyderer det dannede svovljern. Præparatet er bedst efter omtrent $^1/_2$ times forløb, taber sig efter 24 timer.

De jernholdige partier viser sig grønfarvede, dog maa erindres, at reaktionen kun opstaar, hvor jernet er løst bundet til albuminaterne. Hæmoglobin, methæmoglobin, hæmatin osv. reagerer ikke paa svovlammonium.

Metalinstrumenter maa undgaaes, glasnaale anbefales.

Perls ferrocyankalium-saltsyre-reaktion.

1. Snit af alkoholhærdede præparater, — sublimat- eller salpetersyrehærdning uhensigtsmæssig — farves 5—10 min. (ikke længer) i en opløsning af ferrocyankalium og saltsyre, begge 0.5—1 pct., frisk blandet.
2. Udvaskes i let syrligt vand.
3. Undersøges i glycerin eller kanadabalsam.

Hæmosiderinen bliver blaa (berlinerblaat).

Snittene kan paa forhaand farves i lithion- eller alunkarmin, og er ganske holdbare.

Alfabetisk register.

A.

B.

C.

D.

E.

F.

G.

H.

I.

J.

K.

L.

M.

N.

O.

P.

Q.

R.

S.

T.

U.

V.

W.

X.

Z.

Æ.

Ø.

Paa **H. Aschehoug & Co.s forlag** er udkommet:

George A. Haus: Repetitionsblade i normal histologi. 2,00.

Chr. Leegaard: Forelæsninger over sindssygdomme afholdt for distriktslæger høsten 1894. 3,00.

— Elektrotherapi. En kort fremstilling for læger og studerende. Med 30 tegninger. 2,50, indb. 3,30.

— Studier i hjernens almindelige pathologi særlig med hensyn paa lokalisationstheorien og dens begrundelse i anatomi og fysiologi. 4,50.

— Tre forelæsninger for doktorgraden i medicin: I. Om hudlidelser af nevropathisk oprindelse. II. Feberlærens nuværende standpunkt. III. Om hysteri som sygdomsbegreb. 1,25.

Aktie Bogtrykkeriet