

SOBRE'L PROCEDIMENT DE SPALTEHOLTZ EN ANATOMÍA

per

M. SERÉS

Consisteix aquest mètode en fer transparents els teixits i òrguens submergint-los en determinats mitjans líquids. El fonament consisteix en alterar l'índex de refracció dels teixits, fent que sigui igual al del medi en què estàn situats. Es sabut que un cos és tant més transparent com més s'atança el seu grau de refracció al del mitjà transparent on es troba contingut. Per tant, si podem conseguir submergir totes les parts d'aquest teixit en un líquid transparent d'igual índex de refracció que'l teixit, obtindrem aquesta transparència.

Quan el teixit o orgue té un grau de refracció igual al del mitjà transparent on es troba contingut, deixa passar els raigs lluminosos amb el mateix angle que ho fa el mitjà líquid transparent. Per això a l'arribar aquests raigs a la superfície del teixit o orgue, després d'haver passat a través del mitjà líquid, penetren tots en l'interior de l'orgue o teixit, i aleshores es fa completament transparent.

Com més diferencia hi hagi entre l'índex de refracció del mitjà líquid i el del teixit, menys penetraran aquests raigs en el seu interior i, per tant, no hi haurà transparència. En aquest cas els raigs lluminosos, després d'haver

passat a través del líquid, topen amb la superfície del teixit de diferent refracció, i en lloc de penetrar en el seu interior, com en el cas anterior, són totalment reflectits. La transparència no pot tenir lloc. Per tant, en el primer cas els raigs són totalment refractats i en el segon totalment reflectits: la transparència tindrà lloc en el primer cas.

Si l'índex de refracció entre'l mitjà líquid i el teixit no són iguals, però s'atancen bastant, no tindrà lloc la transparència, però els preparats prenen en aquests casos un aspecte lleugerament opac, que no arriba a ésser transparent. En aquest cas, part dels raigs lluminosos són reflectits i altra part penetren en el seu interior.

Des del punt de vista experimental, podem fer la prova següent: submergir el teixit en líquids de menor índex de refracció, i anar-hi afegint líquid de més fort índex de refracció, fins que sigui igual i més tard superior. En el primer cas els teixits seràn opacs, transparents en el segon, i tornarán a ésser opacs quan l'índex de refracció del mitjà líquid sigui superior al del teixit.

Quan hi ha petita diferència entre l'índex del teixit i mitjà líquid, pren el preparat un color blau o rogenc.

La importància d'aquest mètode és molt gran, més que altra cosa des del punt de vista d'investigació, puix sense necessitat de fer cap manipulació sobre l'orgue, i, per tant, essent menys fàcil d'alterar-se sa constitució i relacions, podem estudiar sa estructura interna.

Tècnica. — Les substàncies empleades per a fer el mitjà transparent on s'han de submergir els teixits i òrguens són: l'oli essencial de *gualtheria*, el benzoat de *bencil* i l'*isosaflor*. L'índex de refracció augmenta des de la primera a la tercera, i barrejant-se elles en diferents proporcions, s'obté un mitjà líquid transparent d'igual índex de refracció que'l del teixit.

Ara bé; no n'hi ha prou en submergir l'orgue o teixit dintre d'aquesta mescla de substàncies d'igual índex de refracció. Per a obtenir la transparència cal que penetrin aquestes substàncies en el seu interior i amarín completament tots els teixits.

Per a poder penetrar aquestes substàncies en el seu interior cal que'ls teixits sofreixin manipulacions prèvies que són les següents:

1.^{er} *Fixació*. — Es pot obtenir per l'alcohol, sublimat, formol, etc. Jo he empleat la solució de formol al 5 per 100, donant-me resultats excel·lents. Els òrguens, després de ben rentats, són submergits dintre d'aquesta solució.

2.^{on} *Descalcificació*. — Es fa quan sigui necessària. En anatomia humana es té de fer quan es vol estudiar l'estructura interna dels òssos, i es fa pels mitjans ordinaris.

3.^{er} *Decoloració*. — Per a això he empleat l'aigua oxigenada pura neutralisada o alcalinisada per mitjà de l'amoniac. Com que'l preparat té d'estar ben decolorat, puix si no ho estigués la transparència costaria més d'obtenir-se i no fóra perfecta, canvió dues o tres vegades l'aigua oxigenada.

4.^t *Rentatge*. — Es renta amb aigua de la major puresa possible, i la qual es renova diverses vegades.

5.^è *Deshidratació*. — S'obté per mitjà de l'alcohol. Es posen els preparats en alcohol dèbil de primer i després d'estar-hi diferents dies, es traslladen en alcools de més concentració cada vegada, fins que s'arriba a l'absolut, deshidratat pel sulfat de coure.

6.^è Després de passar per l'alcohol, passen al *benzol*, el qual es renova dues vegades. Així queden en disposició de passar al líquid final.

7.^m *Líquid final*. — Es una mescla de l'oli de gualtheria, benzoat de bencil i isosafrol, en proporció de cada una, diferent per a cada preparat.

8.^{au} *Evacuació de l'aire i benzol.* — S'obté per mitjà d'una bomba aspirant.

El temps que s'ha d'estar el preparat en l'interior dels diferents líquids varia segons el volum de l'orgue, sa densitat i estructura. Hi ha substancies, com l'òs, que tan prompte són descalcificades es deixen penetrar molt depressa per les substancies i, en canvi, n'hi ha d'altres que, com el ronyó, particularment si està injectat, que tarden molt temps en penetrar les diferents substancies fins a la major profunditat i produir efecte, condició indispensable per a que dongui resultat el mètode.

Per això no's poden donar xifres generals de temps, ja que augmenten, en primer lloc, en raó directa del volum i, en segon lloc, també en raó directa de la densitat i estructura: com més dens i compacte sigui un teixit o orgue, més tardarà en ésser penetrat pels líquids. Per això he observat que'ls temps poden ésser més curts en el pulmó que en el ronyó, i per això també el mateix orgue tarda menys a fer-se transparent si pertany a un fetus que a l'home adult. He aplicat bastant el mètode a l'estudi del ronyó i podria formar tres grups amb els preparats d'aquest orgue, segons el temps empleat: 1.^{er}, els ronyons de fetus; 2.^{on}, els d'adults i patològics, i 3.^{er}, els injectats.

Acostumo a deixar al menys cinc dies els preparats en cada líquid; més val pecar per excés que per manca, sobre tot en ço que fa referencia a la deshidratació. Si l'alcohol no ha penetrat perfectament dintre de l'orgue no's farà transparent; per això hi ha preparats que solament es fan transparents en sa capa exterior, prova que les substancies no han obrat profundament.

Quan els preparats passen al benzol, perden la coloració bastant blanca que tenien i prenen desseguida un color burell més o menys groguenc, segons el preparat.

Al mateix temps, es comença ja a veure la transparència, particularment en els teixits i parts menys denses, com el pedícul renal en un ronyó, etc. Convé també que les substàncies estiguin bastant temps en el benzol, sobre tot si són denses, fins que's vegi per sa lleugera transformació que aquest líquid ha penetrat fins a la completa profunditat.

Al fer-se la mescla del líquid final s'ha de fer ben completa, puix tenint diferent velocitat de penetració cada una de les substàncies, podria penetrar en l'interior del teixit una d'elles i no la mescla, la qual cosa faria que no's fes transparent.

L'índex de refracció i pes específic de les substàncies que entren en el líquid final és el següent:

	Índex de refracció	Pes específic
Oli de gualtheria	1'538	1'188
Benzoat de benzil	1'570	1'121
Isosafrol	1'577	1'115

Per a obtenir el líquid apropiat per a cada teixit poden seguir-se dos camins: el de tanteig, o el d'estudiar l'índex de refracció del teixit, per mitjà del refractòmetre, per a obtenir després, amb una o diverses d'aquelles substàncies d'índex conegut, un mitjà transparent d'igual índex de refracció que'l del teixit o orgue. Per mitjà del tanteig s'obté la transparència submergint el preparat en la mescla transparent, i se li afegeix substàncies de refracció superior o inferior, fins a obtenir una mescla d'índex igual al del teixit, en el qual cas es farà transparent. Com que la penetració de les substàncies en l'interior dels òrgans és molt lenta, molt més en diferents teixits, resulta aquesta operació molt llarga.

El millor procediment fóra el según si nosaltres coneguessim l'índex de refracció de tots els teixits; però aquest el coneixem de pocs teixits i, ultra això, en un orgue o embrió complet hi ha teixits de molt diferent índex de refracció.

Quan se sab l'índex de refracció del teixit s'emplea aquesta fórmula:

$$P \frac{n-1}{d} = p_1 \frac{n_1-1}{d_1} + p_2 \frac{n_2-1}{d_2} + \dots$$

$P = pes.$

$n = \text{índex de refracció.}$

$d = \text{densitat de la mescla.}$

p_1 i $p_2 = \text{els dels components.}$

n_1 i $n_2 = \text{els índexs dels components.}$

d_1 i $d_2 = \text{les densitats dels components.}$

Per a arribar a conèixer la relació de les dues parts s'emplea la fórmula de la següent manera:

$$\frac{p_1}{p_2} = \frac{\frac{n_2-1}{d_2} - \frac{n-1}{d}}{\frac{n-1}{d} - \frac{n_1-1}{d_1}}.$$

Per a estudiar l'estructura interna dels òrguens per aquest mètode, convé que'ls teixits no siguin transparents com el cristall, sinó que hi hagi una petita diferencia, sobre tot en sa trama, ja que així sa estructura es fa perfectament visible.

Per altra part, convé que estiguin els preparats ben estesos, formant una sola capa si és que s'arruguen. Com que hi ha aquella petita diferencia entre'l líquid i teixit, quan es formen diverses capes alternades dels dos no dei-

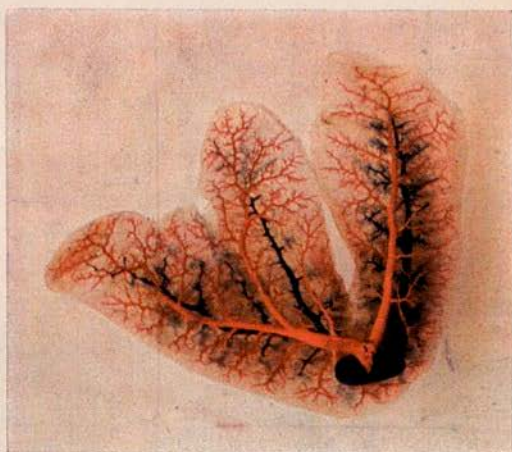
xen passar tan bé la llum: la posició del preparat influeix per tant considerablement.

Ultra això, la superfície principal de l'orgue ha d'ésser paral·lela a la cara del frasc on s'hagi de dirigir la mirada a fi de poder-se veure millor la transparència.

En aquesta fotografia, d'una d'aquestes preparacions es veuen perfectament les arteries injectades en vermell y les venes en blau. En les càpsules suprarrenals que presento, es pot estudiar perfectament la seva estructura interna.

Departament anatòmic. Facultat de Medecina. Granada.

M. Serés.



Pulmó de gat. Diafanització pel mètode de Spalteholtz.

En aquesta cromofotografia es veuen perfectament les arteries injectades en vermell i les venes en blau. En les càpsules suprarrenals que presentà l'autor a la Societat de Biologia, es mostrava clarament la seva estructura interna.