

VI.

Ueber den Einfluss der gebräuchlichen Conservirungs- und Fixationsmethoden auf die Grössenverhältnisse thierischer Zellen.

Aus dem Pathologischen Institut in Berlin.

Von Dr. Carl Kaiserling und Dr. Richard Germer.

Da die feinere Analyse der histologischen Objecte nach Erledigung der makroskopischen Untersuchung auf das Mikroskop angewiesen ist, so ist es eine natürliche Folge in der Entwicklung der histologischen Methoden gewesen, dass die Aufschlüsse, welche auf diesem Wege gewonnen wurden, wesentlich auf dem Gebiete der körperlichen Formen sich finden. Zwar sind von Alters her vielfache Versuche über die chemische Beschaffenheit der kleinen Componenten jener Formen angestellt worden, so dass man wenigstens die wesentlichsten Gruppen der verschiedenen, in der Zusammensetzung vertretenen Körper (Eiweiss, Fett, Schleim u. s. w.) trennen konnte, aber ein tieferer Einblick in die chemische Constitution der Zellen mangelt immer noch.

Den beiden letzten Jahrzehnten gehören die Versuche an, durch elective Färbungen chemisch zusammengehörige Körper hervorzuheben, beziehungsweise ungleichartige zu differenziren, während in früherer Zeit die Färbungen lediglich in Rücksicht auf die Architectur der Theile zur Anwendung gelangten. Die grossen Schwierigkeiten, welche der Anpassung der Methoden der organischen Chemie an das mikroskopische Verfahren hindernd entgegenstehen, haben bisher immer nur einen sehr spärlichen Einblick in die chemische Natur der Gewebe ermöglicht. So aussichtsreich auch der von vielen erfahrenen und berufenen Forschern betretene Weg unzweifelhaft ist, so muss es doch im höchsten Grade wünschenswerth erscheinen, diesen Methoden andere an die Seite zu stellen, welche im Stande sind, weitere Gesichtspunkte zu gewinnen und neue Erfahrungen zu verheissen.

Wenn es als das Endziel der naturwissenschaftlichen Forschung anzusehen ist, die vitalen Vorgänge durch die Gesetze der Mechanik zu erklären, so muss als ein näheres Ziel das Verständniss der körperlichen Formen auf Grund physikalisch-chemischer Untersuchungsmethoden erstrebt werden. Diese Methoden sind deshalb nöthig, weil sie allein durch die exacteste Wissenschaft, die Mathematik, zu verstehen und zu erklären sind.

Ist wirklich Alles in der Natur Gesetz — und das erscheint zweifellos — so kann eine Erkenntniss der Gesetze des Lebens auch nur mit Hülfe der Mathematik erlangt werden. Die Handhaben, welche sie uns bietet, sind die Messmethoden, mit Hülfe deren man Beobachtungen macht, die durch nachherige Analyse zur Feststellung eines Gesetzes führen, mag man nun die Länge und Breite eines Gegenstandes messen, oder die Grösse des Winkels, den ein gebrochener Lichtstrahl mit seiner ursprünglichen Richtung macht, oder die Menge und die Wellenlänge eines irgendwoher ausgestrahlten Lichtes. Wenn auch das höchste Ziel, welches uns zum Messen antreibt, noch so weit von uns abliegt, so dürfen wir uns doch nicht abhalten lassen, eine Methode zu üben, die uns seine Erreichung ermöglichen kann, zumal, wenn sich näherliegende Dinge erreichen lassen.

Es finden sich in der einschlägigen Literatur zerstreut Angaben über die Wirkungsweise differenter Stoffe auf frische Organtheile. Es ist bekannt, dass Alkohol Schrumpfung macht, Essigsäure Quellung u. s. w., es finden sich auch Schätzungen der Differenzen, aber genaue Messungen sind, so weit wir aus der uns zugänglichen Literatur ersehen konnten, nicht gemacht. Das erscheint aber doch von einiger Wichtigkeit, denn indem die Wirkungen verschiedener Mittel auf dasselbe Gewebe und gleicher Mittel auf verschiedene Gewebe genau festgestellt werden, lassen sich werthvolle Einblicke in die physikalische und chemische Beschaffenheit der untersuchten Objecte erwarten.

Da sehr umfangreiche Erfahrungen, die erst allmählich und nach längerer Zeit zu einer zusammenhängenden Vorstellung führen können, gemacht werden müssen, um die Verwerthbarkeit der Methode für allgemeinere Fragen zu ermitteln, so fassen die uns gestellten Aufgaben zunächst rein praktische Fragen in's

Auge. Zu unserer Prüfung gelangten die gebräuchlichen Conservirungs- und Fixationsmethoden.

Wir können die Grössenveränderungen nur durch Messung bestimmen. Leider ist aber die Mikrometrie ein wenig ausgebildeter und geübter Zweig der Mikroskopie. Das liegt zum grossen Theil an der zu messenden Materie. Um die Grösse eines Körpers mit einiger Zuverlässigkeit bestimmen zu können, muss er eine regelmässige Form haben. Regelmässige Körper finden sich aber in den thierischen Organismen nur sehr selten. Die Zellen der verschiedenen Gewebe sind nicht so regelmässig, wie man, verleitet durch die schematisirenden Zeichnungen unserer Lehrbücher der Histologie, annehmen könnte. Das darf uns aber nicht von der Messung abhalten, sondern muss uns anspornen, die sich entgegenstellenden Schwierigkeiten durch vervollkommnete Methoden zu überwinden.

Die Messmethode musste zur Erreichung unseres Zweckes uns erstens die grösstmögliche Genauigkeit gewährleisten, da es sich darum handelte, auch minimale Grössenunterschiede zu bestimmen, und zweitens musste sie uns ermöglichen, eine grosse Reihe von Beobachtungen hinter einander vorzunehmen, ohne dass wie bei dem gewöhnlichen Messverfahren mittelst des Ocularmikrometers und Ocularschraubenmikrometers leicht Ermüdung eintritt und damit Vergrösserung der subjective Fehler. Die letzte Forderung war schon deshalb unumgänglich, weil wir bei der für unsere Arbeit so wichtigen Untersuchung möglichst frischer Objecte genötigt waren, das Material in kürzester Frist auszunutzen. Um beispielsweise beim Blute die einzelnen Präparate mit einander vergleichen zu können, wurden aus derselben Stelle hinter einander Proben entnommen und ihnen die verschiedenen Reagentien zugesetzt, so dass oft 8—10 Präparate zu messen waren. Es ist für 50 Messungen bei Anwendung des Ocularglasmikrometers etwa $\frac{1}{2}$ Stunde erforderlich; bei 10 Präparaten sind das 5 Stunden! Abgesehen von den zu befürchtenden secundären Veränderungen des Präparates, dürfte das aber wohl über die Leistungsfähigkeit eines Menschen hinausgehen. Die anderen Methoden erfordern noch mehr Zeit. So wandten wir uns denn der Photographie als Hülfsmittel zu. Sie bot außerdem den nicht zu unterschätzenden Vortheil, dass sie das jeweilige Bild festzuhalten und nach Jahr und Tag noch zur Controle und als Beweisstück zu verwenden gestattete. Zudem kann man jederzeit messen und so nach dem Princip der Arbeitseintheilung Ueberanstrengungen vermeiden.

Die Messung wird am geeignetsten auf dem Negativ vorgenommen. Wir verfuhren bei unseren Messungen so, dass wir die Negative auf dem Glasstisch eines einfachen sog. Durchleuchters, wie er in O. Israel's Practicum der pathologischen Histologie (2. Auflage) S. 8 abgebildet ist, mit etwa acht-

facher Vergrösserung betrachteten. Als Maassstab wurde eine Millimeterscala mit Unterabtheilungen von halben Millimetern (auf einem Objectträger aufgetragen) benutzt. Durch die Halbierung der Millimeter wird sowohl die Schätzung der Zehntel erleichtert als auch dem weniger Geübten noch eine annähernd zuverlässige Schätzung von Zwanzigsteln ermöglicht. Die letztere ist insbesondere erwünscht bei der Bestimmung des Reductionscoefficienten. Es wird ja das vergrösserte Bild des Objects gemessen; man hat also durch die Vergrösserung zu dividiren, um die wirkliche Grösse zu erhalten. Um diese zu bestimmen, photographirten wir das Objectmikrometer unter denselben Umständen wie das Präparat und maassen das Photogramm mit der Millimeterscala aus und zwar von $0-50\ \mu$, $0-100\ \mu$ u. s. w., weil die Messungs- und Schätzungsfehler bei einer grösseren Strecke natürlich weniger in's Gewicht fallen als bei einer kürzeren und nahmen von 5 oder 6 Messungen das Mittel. Der Werth der Intervalle des Objectmikrometers (1 mm in 100 Theile von Carl Zeiss) war vorher auf der Normal-Aichungsccommission geprüft worden.

Präparat und Mikrometer sollen möglichst unter gleichen Umständen photographirt werden, d. h. unmittelbar nach einander, bei der gleichen Beleuchtung und der gleichen Camera- und Tubuslänge. Die Objectträger sollen möglichst gleich dick sein, weil ja der Abstand von der Frontlinse des Projectionsoculares und der Einstellscheibe sich verändert durch die nötige Aenderung in der Einstellung der Mattscheibe. Damit wird die Vergrösserung grösser oder kleiner, allerdings um recht geringe Beträge, bei 1,2 mm. Unterschied in der Objectträgerdicke etwa 0,5. Es ist ferner nothwendig, falls viele Aufnahmen hinter einander zum Zwecke vergleichender Messungen gemacht werden sollen, dass das Mikrometer öfter, einmal am Anfang, einmal in der Mitte und schliesslich am Ende aufgenommen werde, damit störende Einflüsse, die während der Dauer der Versuche zur Veränderung des Plattenabstandes beitragen, ausgeschlossen werden können. Naamentlich hat sich uns die steigende Temperatur als ein nicht zu unterschätzender Factor erwiesen. An einem Tage, als die Temperatur in unserem engen Arbeitsraume von 12° bis zu 20° gestiegen war, hatte sich auch die Vergrösserung gesteigert von 248,36 auf 248,47 und 249,51 und nach etwa dreistündiger Arbeitszeit auf 250,00. Das Thermometer zeigte dann allerdings 24°C . Als die Witterung draussen nicht mehr ein intensiveres Heizen erforderte, hielt sich die Vergrösserung sehr constant auf 248,44. Jedenfalls genügt eine einmalige Bestimmung der Vergrösserung nicht für die ganze Tageszeit. Wir arbeiteten mit dem grossen Zeiss'schen Apparate. Es lässt sich bekanntlich die gesamme Camera in einer Führung verschieben. Davor ist aber bei Aufnahmen für vergleichende Messungen zu warnen; denn das ändert die Vergrösserung ganz erheblich, selbst wenn ganz sorgfältig angebrachte Marken scheinbar die völlige Restitutio ad integrum ermöglichen. Es ist demnach am einfachsten, die Camera in eine solche Entfernung vom Mikroskop zu bringen, dass der vordere, mit dem Lichtabschluss versehene Theil bei vollem Auszuge ein für alle Mal die gleiche Stellung zum Mikro-

skop einnimmt. Wir benutzten stets den ersten Theil der Camera und zogen ihn soweit aus als möglich. Bei directer Einstellung am Mikroskop brauchten wir nur den vorderen Theil des Cameralbalges zurückzuschieben und hatten so genügend Raum. Ebenso muss das Projectionsocular immer die gleiche Einstellung haben und die Tubuslänge unverändert bleiben.

Zur Bestimmung der Vergrösserung wurden die ersten Theile des Mikrometers photographirt und z. B. bei Mikrometer 167 folgendes Ergebniss gefunden:

I. ist das Mikrometerintervall, W. der Werth seiner Intervalle auf der Platte in mm des Maassstabes, I* ist die wirkliche Grösse der Intervalle in μ , V. die sich ergebende Vergrösserung, auf 2 Decimalen abgerundet.

I.	W.	I*	V.
0—50	12,4	49,9	248,48
0—100	24,9	100,2	248,49
0—150	37,45	150,8	248,34
0—200	49,85	200,6	248,50
0—250	62,3	250,8	248,40

Daraus ergiebt sich das Mittel $248,44 \pm 0,03$.

Der zu befürchtende Fehler bei dieser Bestimmung ist also recht klein. Auf das Verfahren bei der Mikrophotographie kann hier nicht näher eingegangen werden. Als Lichtquelle diente das Zirkonlicht, dessen Benutzung durch die Herstellung comprimirten Sauerstoffs, der von Dr. Th. Elkan, Berlin N. Tegelerstrasse, in Stahlzylindern geliefert wird, sehr erleichtert ist.

Der Beleuchtungskegel war der Aperture der jeweilig benutzten Zeiss'schen Apochromate angepasst. Zur Verwendung kamen Apochromat 8 mm und Apochromat 16 mm von Zeiss. Farbenfilter u. dergl. wurde nur bei künstlich gefärbten Objecten angewendet. Zur Projection diente das Projectionsocular 4 von oben genannter Firma.

Die Wölbung des Gesichtsfeldes ist leider bei den Apochromaten so bedeutend, dass immer nur ein kleiner Theil der Mitte des Gesichtsfeldes benutzbar ist.

Dass auch das Projectionsocular kein planes Gesichtsfeld hat, kann man leicht erkennen, wenn auf seine Blende ein Netzmikrometer aufgelegt und dieses durch Verschieben des Projectionskopfes auf der Einstellscheibe scharf eingestellt wird. So mussten wir uns meist bei voll ausgezogenem ersten Cameraltheil mit einem Gesichtsfeld von etwa 8 cm Durchmesser begnügen.

Die Folge der Wölbung ist auf dem Photogramm natürlich Unschärfe. Die Platte accommodirt nicht, wie das Auge beim Messen mit den Ocularen. Ferner ist die Tiefe der Apochromate eine sehr geringe. Alle diese Umstände, welche bisher noch verhindert haben, dass die Mikrophotographie allgemeiner angewendet wurde, fallen natürlich bei der Aufnahme zu Messzwecken auch in's Gewicht, verursachen aber, dass auch Alles, was gleichmässig scharf erscheint, vollwertig in Rechnung gezogen werden kann. Ein Wechsel in der Einstellung, wo möglich beim Messen desselben Körpers, der bei den anderen Messmethoden recht leicht zu Stande kommt, fällt hier fort.

Wer auf die Anfertigung der abzubildenden Präparate die grösste Sorgfalt verwendet, der wird trotz dieser Mängel immer hinreichend viele Objecte in ein Gesichtsfeld bringen können.

Die Exposition betrug bei der geschilderten Anordnung 1—2 Secunden. Nicht berücksichtigt sind bei den Messungen die Veränderungen, welche die lichtempfindliche Gelatineschicht durch die nachfolgenden Proceduren des Entwickelns, Fixirens, Waschens und Trocknens etwa erleidet.

Die Resultate sind verhältnissmässig sehr genau und werden wohl von denen anderer Methoden nicht übertroffen werden. Allerdings ist exactes Arbeiten nöthig, scharfe Einstellung und genaue Bestimmung der Vergrösserung. Wer die Vergrösserung direct auf der matten Scheibe bestimmt, kann natürlich eben so wenig genaue Resultate erwarten wie der, welcher auf unscharfen Negativen misst.

Wer sich für das Genauere interessirt, findet es nebst einer eingehenden Besprechung der übrigen Messmethoden in der Inaugural-Dissertation: Kaiserling, Die Mikrometrie und ihre Anwendung u. s. w. (Berlin, März 1893.)

Nicht geringere Schwierigkeiten wie die Wahl einer geeigneten Messmethode bot das Finden passender Untersuchungsobjecte. Wir bedurften zu unserem Zwecke Zellen, welche einer genauen Messung zugänglich waren. Zuerst versuchten wir es mit pflanzlichen Mikroorganismen. Aber nach zahlreichen Versuchen standen wir hiervon ab. Denn abgesehen von den Schwierigkeiten, die es macht, lebende bewegliche Bacillen zu photographiren, ist die Zellnatur der Bakterien noch so wenig aufgeklärt, dass die Bearbeitung gerade dieses Objects uns vorläufig noch verfrüht erschien. Auch mit den Leberzellen, die wir sodann vornahmen, kamen wir nicht weiter. Gerade hierbei gingen uns die Schwierigkeiten auf, welche sich dem Beginnen entgegenstellen, organisierte Gebilde in mathematische Formeln zu zwängen. Die Leberzellen besitzen eben nicht die geraden sechseckigen Contouren, die ihnen in den meisten Lehrbüchern zugeschrieben werden. Besseres schon schienen uns die Cylinderepithelzellen an den Spitzen der Markkegel der Nieren zu versprechen. Aber wir standen einstweilen überhaupt von diesen schwierigeren Aufgaben ab, sie einer späteren Bearbeitung vorbehaltend. Die einfachsten Zellen, welche wir im thierischen Organismus zu finden vermochten, waren die rothen Blutkörperchen der Vertebraten und die Ovula von Säugethieren. Verwendet wurden meistens Ovarien von Kühen.

Die Präparation der Eizellen wurde in der Weise vorgenommen, dass zunächst die mit Liquor folliculi gefüllten Follikel aus dem Ovarium herauspräparirt und dann auf dem Objectträger mit einem spitzen Messer geöffnet wurden. In dem austretenden Liquor wurde dann das Ei mit schwachen Vergrösserungen gesucht, von dem herumsitzenden Follikelepithel möglichst befreit und in zugesetztem Liquor photographirt. Als Kriterium für eine Grössenveränderung kann natürlich immer nur der Vergleich mit dem frischen lebenden Object dienen. Der Druck des Deckglases wurde durch zwischengelegte Kopfhaare vermieden. Die benutzten Objectträger hatten sämmtlich die gleiche Dicke (1,2 mm), ebenso die Deckgläschen (0,08 mm).

Die Grösse der einem Ovarium entnommenen Ovula ist eine so wechselnde, dass es nöthig war, immer ein und dasselbe Ei erst frisch, dann in dem betreffenden zu untersuchenden Reagens zu messen. Der Vorwurf, dass eine genaue Ermittlung des Einflusses der Reagentien an dem Fehlen einer Constante scheitern müsse, ist wenigstens in Bezug auf diesen Theil der Arbeit durch nichts begründet.

Der Gang der Untersuchung war nun folgender:

1. Untersuchung eines Eies in Liquor folliculi.
2. Untersuchung desselben Eies in physiologischer Kochsalzlösung, welche durch die bekannte Durchsauge-methode zur Einwirkung gelangte.
3. Untersuchung desselben Eies in dem betreffenden Fixationsmittel.

Der Grund dafür, dass wir die Fixationsmittel nicht direct auf das Ei in dem Liquor folliculi einwirken liessen, lag darin, dass die zum Theil eiweisscoagulirenden Fixationsmittel in dem eiweissreichen Liquor einen dicken Niederschlag hervorriefen. Dies konnte ohne Nachtheil für die Ergebnisse geschehen, weil ja vorher genau der Einfluss der physiologischen Kochsalzlösung zahlenmässig bestimmt war. Immerhin kann ein Unterschied möglich sein, ob man direct die Fixationsflüssigkeit zusetzt oder nach vorheriger Abspülung mit Kochsalzlösung. Die Untersuchungen hierüber sind noch im Gange.

Das Blut wurde, nachdem verschiedene Methoden versucht waren, so gewonnen, dass beim Frosch ein Schnitt in die gut

gereinigte Haut des vorderen Randes des Oberkiefers gemacht wurde, beim Kaninchen in das Ohr, bei der Taube in die Wachshaut des Schnabels und beim Menschen in die Fingerkuppe. Das Zusetzen der Conservirungsmittel geschah so, dass das mit dem Blutropfchen beschickte Deckglas auf den vorher mit einem ziemlich grossen Tropfen versehenen Objectträger aufgelegt wurde. Um eine genügende Wirkung auf die einzelnen Elemente zu erzielen, wurde der Bluttropfen so gross genommen, dass das Deckglas auf letzterem schwamm. So war es möglich, ohne dass Verletzungen der Blutkörperchen durch Reibung am Glase zu befürchten gewesen wären, das Deckgläschen hin und her zu schieben. Schliesslich wurde mit Fliesspapier der Rest abgesaugt und durch den dabei entstehenden Strom die Elemente nochmals in der Zusatzflüssigkeit bewegt.

Vergleichsweise gewannen wir dann das Blut in den Fällen, wo Zusätze zu ihm gemacht werden sollten, so, dass das betreffende Conservirungsmittel auf die zur Entnahme gewählte Stelle gebracht und durch diese hindurch incidirt wurde, so dass also jede Berührung mit der atmosphärischen Luft ausgeschlossen war. Die Entnahme unter dem Tropfen hat den Nachtheil, dass das Blut in dicken Klumpen fixirt und so häufig genug der Fall eintritt, dass sich im ganzen Präparat keine Stelle findet, die dünn genug ist, um gemessen werden zu können. Auch dauerte es sehr lange, bis die einzelnen Elemente auf dem vertical stehenden Tische des photographischen Mikroskopes zur Ruhe kamen. Oft thaten sie es überhaupt nicht. Da wurde dann in dem Beobachter der Wunsch rege, die Präparate auf dem horizontal liegenden Tische zu photographiren. Der Zeiss'sche Apparat gestattet, den vorderen Theil der Camera aufzurichten. Dann muss aber das Mikroskop von dem eigentlichen Projections-tische heruntergenommen und tiefer auf einem besonderen Schenkel aufgestellt werden. Damit fällt die Möglichkeit, die optische Bank zu benutzen, weg, es sei denn, man nehme die ganze Sache auseinander und versuche den Tisch so tief anzubringen, dass der Lichtkegel der Flamme in richtiger Höhe den Spiegel trifft. Vor diesem Kunststück sei Jeder gewarnt. Bei einer gelegentlichen Rücksprache mit dem Vertreter der Firma erklärte dieser, dass auch andere Mikrophotographen dieselbe Ausstellung

gemacht haben, und dass in Folge dessen künftig der vordere Theil nicht aufrichtbar gemacht werden soll. Das ist aber eine merkwürdige Verbesserung!

Nachdem die Art und Weise, wie die Präparate einwandfrei hergestellt werden mussten, genügend festgestellt war, kam die Frage zur Entscheidung, welches Maass eines Blutkörperchens als das Grundmaass aufzufassen sei. Die Antwort ist natürlich: das, welches es im lebenden Körper hat. Sollte es möglich sein, 25—30 Blutkörperchen mit aller Schärfe und Genauigkeit in dem Gefässe zu messen, so dürfte diese Bestimmung jedenfalls so schwierig sein, dass ihr ein praktischer Werth nicht zu kommt. So wählten wir als Constante die Grösse, welche die Blutkörperchen im frischen Präparate ohne jeden Zusatz untersucht besitzen, vorausgesetzt natürlich, dass sie gröbere Veränderungen nicht wahrnehmen lassen. Bis diese eintreten, vergeht eine Zeit, die hinreichend lang ist, um die photographische Aufnahme zu bewerkstelligen. Vom Schnitt in die Haut bis zur vollendeten Aufnahme sind $1\frac{1}{2}$ bis höchstens 2 Minuten erforderlich. Meistens erhalten sich die Objecte noch viel länger frisch und brauchbar.

Um jede Verdunstung zu vermeiden, wurden die Deckglässchen bei allen Untersuchungen, sowohl der Eier wie des Blutes, mit Paraffin umrandet.

Es ist nun für die Kritik der Messungen sehr wichtig, den Fehler kennen zu lernen, welcher auch bei der genauesten Messung dem gefundenen Mittelwerth noch anhaftet kann. Gauss hat uns gelehrt, aus den Fehlern der einzelnen Messungen gegen das Gesamtmittel diesen noch zu befürchtenden Fehler zu berechnen. Dies geschieht nach der bekannten Formel:

$$M = \sqrt{\frac{\Sigma v^2}{m-1}} \quad \text{oder} \quad \sqrt{\frac{\Sigma v^2}{m(m-1)}},$$

wo m die Anzahl der Einzelmessungen ist, v die Differenz gegen das Gesamtmittel.

Um die Genauigkeit einer Maassangabe beurtheilen zu können, ist es durchaus nöthig, dass der mittlere Fehler dem Resultate beigefügt wird. Wenn das geschieht, sind auch die verschiedenartigen Abweichungen der Resultate verschiedener For-

scher besser zu controliren und zu beurtheilen. Näheres darüber findet sich in der bereits erwähnten Arbeit „Die Mikrometrie u.s.w.“.

Es stellte sich nun als Grösse der frisch und ohne Zusatz gemessenen rothen Blutkörperchen als Mittel aus einer grossen Anzahl von Messungen, mindestens von je 25 an 3 verschiedenen Tagen, aber stets von demselben Thiere, folgender Betrag heraus:

Froschblutkörperchen Längsdurchmesser $25,92 \pm 0,17 \mu$.

Querdurchmesser $17,69 \pm 0,10 \mu$.

Taubenblut Längsdurchmesser . . . $15,39 \pm 0,07 \mu$.

Querdurchmesser . . . $5,87 \pm 0,04 \mu$.

Kaninchenblut war frisch nicht zu messen.

Menschenblut $7,88 \pm 0,06 \mu$.

Wir betrachten nun zuerst die Veränderungen, welchen unsere Objecte in der physiologischen Kochsalzlösung unterlagen.

Schon der Name „physiologische Kochsalzlösung“ vindicirt für diese Flüssigkeit, dass sie sich indifferent verhält gegen thierische Gewebe. Die Annahme, dass ein und dieselbe Flüssigkeit sich gegen die unter einander chemisch wie morphologisch so verschiedenen histologischen Objecte indifferent verhalten soll, muss von vornherein befreudlich erscheinen. Zur Verwendung kam die Kochsalzlösung also 0,6 pCt. und 0,75 pCt.

Froschblut. Die Blutkörperchen sind auffallend scharf begrenzt, die Kerne deutlicher und häufig leicht unregelmässig, besonders in 0,75prozentiger Lösung.

$L = 25,92 \pm 0,17 \mu$ $Q = 17,67 \pm 0,09 \mu$.

Die Grösse ist also nicht verändert.

Taubenblut. Sowohl 0,6- als 0,75prozentige NaCl-Lösung verändern die Blutkörperchen. Die Contouren sind auffallend unscharf, so dass es nur schwer gelang, einigermaassen brauchbare Negative zu erhalten. Der Grund ist wohl die Quellung im Dicken durchmesser.

$L = 16,11 \mu \pm 0,06 \mu$ $Q = 6,48 \mu \pm 0,04 \mu$.

Es zeigt sich also in beiden Durchmessern eine Zunahme.

Kaninchenblut. Sowohl 0,6- als 0,75prozentige Lösung verändert fast alle rothen Blutkörperchen, welche zum Theil ganz sonderbare Formen annehmen. Da in allen Präparaten diese Verunstaltung wiederkehrte, so musste von einer Messung Abstand genommen werden.

Menschenblut verhält sich ganz ähnlich. Auch hier waren keine befriedigenden Resultate zu erlangen.

Die Verhältnisse bei den Eizellen lagen insofern anders, als hier nicht von einer constanten Grösse die Rede sein kann.

Die Dauer der Einwirkung der Reagentien auf die Eizellen betrug durchschnittlich 15 Minuten. Gemessen wurden auf dem Negativ an jedem Ei vier Durchmesser, welche gegen einander um 45° geneigt waren. Die Aufzeichnung dieser Durchmesser auf durchsichtigem Oelpapier, welches auf dem Präparirstativ unter das zu messende Negativ gelegt wurde, ermöglichte es, den in halbe Millimeter getheilten Maassstab immer entsprechend diesen Durchmessern anzulegen. Aus diesen vier Durchmessern geben wir in den nachfolgenden Beispielen immer das arithmetische Mittel.

1. Mittlerer Durchmesser in Liquor folliculi = 0,1598 mm.
- - - - - NaCl-Lösung = 0,173 -

Für das Volumen der Eier, welche wir als Kugeln betrachten, erhalten wir nach der bekannten Formel $\frac{4}{3}\pi r^3$ folgende Werthe:

Vol. des Eies in Liquor folliculi . . . = 0,0021367 cmm.
- - - - - 0,6 proc. NaCl-Lösung = 0,0026644 -

Mit der Auffassung des Eies als Kugel können wir uns übrigens auf das Urtheil von Waldeyer berufen, der das Ei „als eine wenn auch nicht ganz regelmässige Kugel“ betrachtet.

Die Zunahme des Eies in physiologischer Kochsalzlösung beträgt demnach 0,0005277 cmm. Diese Zunahme ist nicht etwa gering anzuschlagen. Drücken wir die Zunahme in μ ($1\mu = \frac{1}{1000}$ mm) aus, dann erhalten wir den Werth von $527700\mu^3$.

2. Mittl. Durchmesser in Liquor folliculi = 0,13176 mm.
- - - - - NaCl-Lösung = 0,139 -

Vol. des frischen Eies = 0,0011975 cmm.
- - - Eies in 0,6 proc. NaCl-Lös. = 0,001406 -

Zunahme in 0,6 proc. Kochsalzlösung = 0,000209 -

3. Mittl. Durchmesser in Liquor folliculi = 0,1372 mm.
- - - - - NaCl-Lösung = 0,1424 -

Volumen in Liquor folliculi = 0,0013522 cmm.
- - - 0,75 proc. NaCl-Lösung = 0,001512 -

Zunahme in 0,75 proc. NaCl-Lösung = 0,00016 -

Ob die durch alle Versuche durchgehende Vergrösserung in physiologischer Kochsalzlösung auf einer einfachen Wasserimbibition beruht, darüber kann man sich nur Muthmaassungen hingeben. Jedenfalls hat diese Annahme viel Wahrscheinlichkeit, wenn man den etwas visciden, stark paralbuminhaltigen Liquor folliculi mit der wässrigen Beschaffenheit der Kochsalzlösung vergleicht.

Dass die Grössenveränderungen der Eizellen nicht immer in ganz gleichem Maasse stattfinden, kann eigentlich nur bei Dem Befremden erregen, der in schematischer Weise sämmtliche Zellen als gleichwerthig betrachtet. In Wirklichkeit ist doch aber jede Eizelle von der anderen verschieden; die eine ist vielleicht reifer, die andere noch in jugendlicherem Zustande, die eine reicher an Protoplasma, die andere an Deuteroplasma. Es liegt uns nichts daran, mit bestimmten einfachen Zahlen aufzutreten und vielleicht zu behaupten, die Eizellen nehmen um so und so viel Prozent in Kochsalzlösung zu, sondern wir constatiren an einzelnen Zellen die Grössenzunahme, hüten uns aber wohl, den Werth dieser Grössenzunahme als constant und feststehend einzustellen.

Kochmethode.

Die Kochmethode erscheint als eine chemisch relativ indifferentie, mehr rein physikalische Einwirkung auf die Zellen. Die Versuche wurden an Ovarien von frisch getöteten Kaninchen in der Weise angestellt, dass wir zunächst möglichst schnell das Ei in dem spärlichen Liquor folliculi maassen, dann in zugesetzter Kochsalzlösung und schliesslich auf dem Objectträger über einem Bunsenbrenner erhitzten, und zwar zunächst bis Dampf aufstieg, sodann bis Blasen sprangen.

1. Mittl. Durchm. in Liquor folliculi . . . =	0,1327 mm.
- - - - physiol. NaCl-Lösung =	0,1425 -
schwach erhitzt =	0,1311 -
intensiv erhitzt =	0,1046 -
Volumen in Liquor folliculi =	0,001223 cmm.
- - Kochsalzlösung =	0,001512 -
schwach erhitzt =	0,001177 -
intensiv erhitzt =	0,0005992 -

2. Mittl. Durchmesser in Kochsalzlösung	= 0,1333 mm.
schwach erhitzt	= 0,1267 -
intensiv erhitzt	= 0,1212 -
Volumen in Kochsalzlösung	= 0,001237 cmm.
schwach erhitzt	= 0,001065 -
intensiv erhitzt	= 0,0009322 -

Die Contouren bleiben gut erhalten. Die Schrumpfung ist grösser oder geringer, je nachdem man mehr oder weniger intensiv erhitzt. Bei weiteren Versuchen hoffen wir die Stärke und Dauer der Erhitzung noch genauer reguliren zu können. Wir denken hierbei besonders an das Erhitzen auf einem genau temperirten Wasserbade.

Hayem'sche Lösung.

Als Lösung wurde benutzt:

Hydrarg. bichlorat.	0,5
Natr. chlorat.	. . . 2,0
Natr. sulfuric.	. . . 5,0
Aqua destillatae	200,0.

Frosch. Kerne granulirt. Die Form der rothen Blutkörperchen ist häufig verändert; sie zeigen Falten und werden sehr brüchig. Bei einer etwas älteren Lösung fand bei zahlreichen Blutkörperchen Austritt des Hämoglobins statt. Die sogenannten Schatten nehmen eine fast runde Form (von der Fläche gesehen) an, während die Gestalt der nicht entfärbten erhalten blieb. Merkwürdigerweise sind die Grössenverhältnisse constanter als beim frischen Blute, die Abweichungen der verschiedenen Präparate geringer.

$$L = 24,44 \pm 0,13 \mu \quad Q = 16,49 \pm 0,17 \mu.$$

Demnach ist in beiden Durchmessern eine Abnahme der Grösse eingetreten von $1,5 \mu$ und $1,2 \mu$.

Taube. Auch hier sind die Kerne granulirt, die Blutkörperchen sind scheinbar härter geworden, was sich dadurch offenbart, dass sie bei vertical stehendem Objecttische stets schwimmen und durch Druck auf das Deckglas stark beschädigt werden. Oft sind die Elemente des Blutes so verändert worden, dass von einer Messung abgesehen wurde.

$$L = 14,61 \mu \pm 0,10 \mu \quad Q = 5,88 \mu \pm 0,048 \mu.$$

Die einzelnen Blutkörperchen weichen stark von einander ab im Längsdurchmesser. Daher ist der Fehlerbetrag sehr hoch, nahe doppelt so gross als beim frischen Blute.

Kaninchen. Für Kaninchenblut ist diese Lösung ganz unbrauchbar, da alle Elemente zu kleinen stechpfeiförmigen Kugeln zusammenschnurren. Da die Form verloren ging, konnte eine Messung von keinem Werthe sein.

Mensch. Die Form ist bei Flächenansicht im Grossen und Ganzen die eines Kreises geblieben, nur hebt sich der Rand schärfer ab, wie es beim frischen Blute der Fall ist. Es fehlen nicht längliche und ganz unregelmässige Formen.

$$D = 7,30 \pm 0,08 \mu,$$

so dass eine Abnahme von $0,5 \mu$ erfolgt ist.

Die Hayem'sche Lösung verursacht aller Wahrscheinlichkeit nach eine Härtung der Elemente des Blutes, jedenfalls stets eine Verkleinerung. Die Form bleibt erhalten mit Ausnahme der bei Kaninchenblutkörpern. —

Für die Eizellen wurde das Sublimat in 2 Formen angewendet:

I. als gesättigte Lösung nach Heidenhain,

II. in Form der Hayem'schen Flüssigkeit.

- | | |
|-------------------------------------|------------------|
| 1. Mittlerer Durchm. in NaCl-Lösung | = 0,1679 mm. |
| - Lösung I . | = 0,1556 - |
| Volumen in NaCl-Lösung . . . | = 0,0024783 cmm. |
| - Sublimatlösung . . | = 0,0019725 - |
| Differenz | = 0,0005058 - |
| 2. Mittlerer Durchm. in NaCl-Lösung | = 0,1893 mm. |
| - Lösung I . | = 0,1664 - |
| Volumen in NaCl-Lösung . . . | = 0,0035462 cmm. |
| - Sublimatlösung . . | = 0,0024124 - |
| Differenz | = 0,0011338 - |
| 3. Mittlerer Durchm. in NaCl-Lösung | = 0,1648 mm. |
| - Lösung I . | = 0,1454 - |
| Volumen in NaCl-Lösung . . . | = 0,0023436 cmm. |
| - Sublimatlösung . . | = 0,0016094 - |
| Differenz | = 0,0007342 - |

Neben dieser starken Schrumpfung platzt an den Eizellen bei Anwendung dieser wohl zu stark wirkenden Lösung die Zona

pellucida. Dies kehrt an den einzelnen Präparaten mit solcher Regelmässigkeit wieder, dass man an einen Zufall wohl kaum glauben kann. Viel besser erhält die Hayem'sche Lösung von der oben genannten Concentration die Contouren der Zellen.

1.	Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung	= 0,15002 mm.
	- - - - - Hayem'scher Fl.	= 0,125 - - - - -
	Volumen in NaCl-Lösung . . .	= 0,0017679 cmm.
	- - - - - Hayem'scher Flüss.	= 0,0010226 - - - - -
	Differenz	= 0,0007453 - - - - -
2.	Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung .	= 0,1248 mm.
	- - - - - Hayem'scher Fl.	= 0,1204 - - - - -
	Volumen in NaCl-Lösung . . .	= 0,0010177 cmm.
	- - - - - Hayem'scher Flüss.	= 0,0009139 - - - - -
	Differenz	= 0,0001038 - - - - -

Die schrumpfende Wirkung des Sublimats beruht auf der Coagulirung des Eiweisses. Damit hängt auch der Umstand zusammen, dass das innere Strukturbild der Eizellen durch die Anwendung des Sublimats von dem frischer Objecte total verschieden ist. Man sieht eigentlich nur noch einen gleichmässigen Niederschlag, ohne Einzelheiten an dem Bilde unterscheiden zu können.

Lugol'sche Lösung.

Es wurde gelöst: Kal. iodat. 2,0
Jodi 1,0
Aq. dest. 100.

Diese Vorrathslösung wurde auch mit 3 Theilen H₂O gemischt angewendet. Sie färbt die rothen Blutkörperchen bekanntlich gelb bis braun, je nach der angewendeten Concentration.

Frosch. Die stärkere Lösung bewirkt, dass die Kerne granulirt erscheinen und quellen, so dass sie grösser und mehr rund sind, während der übrige Theil der Blutkörperchen im Dicken-durchmesser stark verdünnt wird, so dass ein auf der Seite liegendes Blutkörperchen einen Anblick gewährt, der am besten mit dem des Saturn und seiner Ringe zu vergleichen ist.

Die schwächere Lösung wirkt sehr energisch auf die rothen Blutkörperchen. Die Kerne verhalten sich wie bei der starken, der übrige Zellinhalt ist granulirt, das Hämoglobin niederge-

schlagen, häufig um den Kern herum zusammengeballt oder auch ausgetreten.

Die Form ist sehr wechselnd, von der elliptischen bis zur rundlichen. Ja es finden sich sogar Elemente, deren Breitendurchmesser grösser ist als der Längsdurchmesser. Da die Durchmesser zu sehr schwanken, kann eine Mittelzahl nicht angegeben werden. Bei 250facher Vergrösserung auf dem Negativ gemessen, wechseln die Dimensionen in mm des Maassstabes angegeben im Längsdurchm. von 5,4—4,1, Querdurchm. von 4,8—3,5.

Um die Verschiedenheit zu zeigen, führen wir einige Maasse in derselben Angabe hier an:

(frisches Blut $L = 6,35$, $Q = 5,27$)

5,2	3,9	5,6	4,4
5,4	4,4	5,4	3,7
4,0	5,0	4,0	4,5
4,3	4,3	4,6	4,5

Diese Beispiele mögen genügen, um zu zeigen, wie sehr das Verhältniss der beiden Durchmesser gestört und die Gesamtgrösse verringert ist.

Bei der besser conservirenden starken Lösung waren die Maasse

$$L = 22,90 \pm 0,12 \mu, Q = 14,53 \pm 0,08 \mu.$$

Es ist eine Verkleinerung eingetreten im L um 3μ und im Q um $3,16 \mu$, oder im L um etwa $\frac{1}{8}$, im Q um $\frac{1}{6}$. Auch hier zeigt sich die Formveränderung deutlich.

Taube. Die schwache Lösung macht die Blutkörperchen rund und bewirkt Austritt des Hämoglobins, so dass das Bild dem bei Flemming'scher Lösung durchaus ähnelt. In der starken zeigen sich die Kerne granulirt und das Hämoglobin dann und wann ausgetreten, während die elliptische Form deutlich erhalten ist.

$$L = 13,66 \pm 0,06 \mu, Q = 5,64 \pm 0,04 \mu.$$

L also verkleinert um $1,73 \mu$ oder etwa $\frac{1}{8}$, Q um $0,23 \mu$.

Kaninchen. Nur die starke Lösung erhält die Form gut, dabei fällt jedoch auf, dass etwa $\frac{1}{6}$ aller rothen Blutkörperchen grösser ist, und zwar um beinahe $\frac{1}{2}$ der Durchschnittsgrösse. Ihnen entsprechen eine geringere Anzahl, die nur die halbe Durchschnittsgrösse haben. Beide sind in der folgenden Mittelzahl nicht eingerechnet:

$$D = 5,37 \pm 0,08 \mu.$$

Wenn nun auch sicher ist, dass die Blutkörperchen im Verhältniss zu den frischen verkleinert sind, so ist doch eine bestimmte Angabe nicht möglich, weil sich die Grösse der frischen Blutkörperchen bekanntlich nicht feststellen liess.

Mensch. Die concentrirtere Lösung erzeugt ganz unregelmässige und stachelfähnliche stark geschrumpfte Formen, während die mit 3 Theilen Wasser verdünnte Mischung die runde Form gut erhält, jedoch ein feinkörniges Aussehen der rothen Blutkörperchen verursacht.

$$D = 6,01 \pm 0,04 \mu.$$

Der Verlust beträgt gegenüber dem frischen Blute $1,87 \mu$, d. h. etwa ein Viertel.

Fassen wir also die Ergebnisse der Wirkung Lugol'scher Lösung zusammen, so ergiebt sich als gemeinsam die Fällung des Hämoglobins. Ob diese allein hinreicht, um den Verlust der einzelnen Blutkörperchen an Grösse zu erklären, ist nicht wahrscheinlich.

Obwohl dieses Fixationsmittel für Eizellen wohl kaum im Gebrauche ist, schien es uns doch interessant, seine Wirkung zum Vergleiche mit denen beim Blute erlangten Resultaten zu studiren. Diese Wirkung wird gewöhnlich auf die Coagulation des Eiweisses geschoben.

1.	Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung .	=	0,1714 mm.
	- - - Lugol'scher Lös.	=	0,1364 -
	Volumen in NaCl-Lösung . . .	=	0,0026363 cmm.
	- - - Lugol'scher Lösung .	=	0,0013287 -
	Differenz	=	0,0013076 -
2.	Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung .	=	0,156 mm.
	- - - Lugol'scher Lös.	=	0,1217 -
	Volumen in NaCl-Lösung . . .	=	0,0019877 cmm.
	- - - Lugol'scher Lösung .	=	0,0009414 -
	Differenz	=	0,0010463 -

Flemming'sche Lösung.

Zusammensetzung der angewendeten Lösung:

Acid. hyperosmic. 1 pCt. 10 ccm

- chrom. 1 - 25 -

- acetic. 1 - 10 -

Aqua dest. 55,0.

Frosch. Das Hämoglobin zeigt sich in dem einen Theil der Blutkörperchen niedergeschlagen und in Fasern um den Kern gruppirt. Die Membran hebt sich deutlich von dem etwas zurückgezogenen Zellinhalt ab. Die Kerne sind grob granulirt. Die Zellcontouren sind nicht mehr regelmässig, sondern zeigen grössere Einbuchtungen, die Form ist mehr rund.

Bei einem anderen Theil der Blutkörperchen sind zwar die Contouren und die Formen besser erhalten, aber der Inhalt ist noch weiter von der Membran zurückgezogen und um den Kern gelagert. Das Hämoglobin ist feinkörniger, vielfach ausgetreten. Das Verhalten der Kerne ist das gleiche.

$L = 20,1 \pm 0,26 \mu$, $Q = 15,91 \pm 0,28 \mu$ bei der ersten Gruppe.
 $L = 21,01 \pm 0,17 \mu$, $Q = 13,16 \pm 0,12 \mu$ - - zweiten

Die durchschnittliche Verkleinerung beträgt demnach bei
 $L = 4,4 \mu$, bei $Q = 1,8 - 4,5 \mu$.

Die grosse Unregelmässigkeit der einzelnen Elemente unter einander bei der ersten Gruppe prägt sich auch in dem grossen mittleren Fehler deutlich aus.

Taube. Sämtliche rothen Blutkörperchen haben ihre normale Gestalt verloren und sind kugelig geworden, fast alles Hämoglobin ist ausgetreten, vereinzelt Vacuolenbildung. Die Kerne erscheinen leicht granulirt, in der Form gut erhalten. Da die Wirkung sehr unregelmässig ist, dürfte eine Mittelzahl nicht am Platze sein. Man kann 2 Gruppen zusammenfassen:

- 1) $L = 10,07 \pm 0,04 \mu$. $Q = 9,90 \pm 0,05 \mu$.
- 2) $L = 8,68 \pm 0,1 \mu$. $Q = 9,44 \pm 0,03 \mu$.

Die Veränderungen sind also bei

- 1) $L = 5,32 \mu$ $Q + 4,03 \mu$
- 2) $L = 6,71 \mu$ $Q + 3,57 \mu$.

Kaninchen. Das Hämoglobin wird niedergeschlagen und tritt häufig in Klumpen zusammen, welche dann nicht selten als solche austreten. Die überwiegende Mehrzahl der Blutkörperchen zeigt eine Vacuole. Das einzelne Blutkörperchen wird eine Blase, eine Kugel mit auffallend deutlichen Contouren, so dass man den Eindruck gewinnt, dass die äusserste Schicht aus einer anderen Substanz besteht als der Inhalt. Diese äussere Schicht stellt eine Art Membran dar. Ein schwammartiger Körper kann wohl eine Kugel werden, aber keine Hohlkugel.

Auf einem mit Homog. Imm. 2 mm, 1,30 Ap. angefertigten Photogramm zeigt sich bei den Blutscheiben eine helle Contour, dann folgt ein dunkler Kreis und im Centrum das noch in ganzer Masse zusammenhängende Hämoglobin mit beginnender Vacuolenbildung. Andere zeigen alle Entwickelungsstadien bis zur einfachen Blase ohne jeden Inhalt. Bei der Beobachtung frischen Blutes bemerkten wir Folgendes: Am Rande des Bluttropfens, der nicht den ganzen Raum unter dem Deckglase ausfüllte, bildeten sich durch weiteres Vordringen der Flüssigkeit kleine Kanäle und Gänge, welche zwischen sich Luftblasen einschlossen, so dass das Ganze gleichsam ein Capillarsystem darstellte. In den Kanälchen herrschte eine lebhafte Strömung, und diese Stellen waren die einzigen im ganzen Präparate, wo die rothen Blutscheibchen ihre Form bewahrt hatten. Es zeigte sich nun deutlich die Elasticität der Scheibchen. Wenn ein solches sich durch eine enge Stelle zwängen musste, so sah man, dass das eigentliche Scheibchen von einer durchsichtigen Hülle umgeben war, welche weit elastischer war als der gefärbte Theil und viel länger ausgezogen wurde. Zufolge dessen dauerte es auch länger, bis sie ihre frühere Gestalt angenommen hatte. Man sah also das rothe Scheibchen und hinter ihm (in der Stromrichtung gesehen) eine farblose Fortsetzung, schmäler als das Blutkörperchen, so dass ein Bild entstand, wie es der Längsdurchschnitt einer Birne etwa bietet, abgesehen von dem Farbenunterschiede. Häufig blieben die Scheibchen kleben. Bei Betrachtung mit Hom. Imm. 2 mm, 1,30 Ap. Compens. ocul. 6 sah man in diesen Fällen vom Scheibchen einen feinen fadenförmigen Fortsatz ausgehen, der sich in die Hauptmasse zurückzog, sobald der Strom das Blutkörperchen losriß. Die Untersuchungen über die Bedeutung dieser Erscheinungen sind noch nicht abgeschlossen.

$$\text{Es beträgt } D = 6,45 \pm 0,003 \mu.$$

Mensch. Das Blut wird in dicken Klumpen fixirt, das Hämoglobin tritt aus, Vacuolen wurden nicht beobachtet. In Folge der klumpigen Gerinnung, welche bei jeder Anordnung des Versuches eintrat, konnten keine für Messzwecke geeigneten Photogramme gewonnen werden. Auch hier erscheint das Ganze als farblose Kugel, die Contour scharf.

Für Eier ergab sich:

1. Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung . . . = 0,1752 mm.
 - - - Flemming'scher Lösung = 0,1819 -
 Vol. des Eies in physiolog. Kochsalzlös. = 0,0028157 cmm.
 - - - Flemming'scher Lösung = 0,0031519 -
 Zunahme in Flemming'scher Lösung . . . = 0,0003362 -
2. Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung . . . = 0,1592 mm.
 - - - Flemming'scher Lösung = 0,1713 -
 Volumen in NaCl-Lösung = 0,0021126 cmm.
 - - - Flemming'scher Lösung . . . = 0,0026272 -
 Volumenzunahme = 0,0005146 -
3. Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung . . . = 0,1357 mm.
 - - - Flemming'scher Lösung = 0,1532 -
 Volumen in NaCl-Lösung = 0,001305 cmm.
 - - - Flemming'scher Lösung : = 0,0018827 -
 Volumenzunahme in Flemming'scher Lös. = 0,0005772 -

Welchem Bestandtheil der Flemming'schen Lösung diese Quellung zuzuschreiben ist, lassen wir dahingestellt. Die Fixirung mit dem Flemming'schen Chromosmiumessigsäuregemisch leistet übrigens für Eizellen nicht das, was man von einem guten Fixationsmittel erwartet. Die Eier verlieren meistens ihre scharfen Contouren, so dass gerade diese Messungen mit grossen Schwierigkeiten verknüpft waren. Zudem wird in die Gewebeelemente eine neue Strukturanordnung hineingebracht, die man an dem frischen Objecte vergeblich suchen würde. Kultschitzky (Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie, 1887) möchte diese Wirkung der Chromsäure zuschieben. Viel bessere Resultate giebt die Fixirung in Osmiumsäure. Wir benutzten eine 1prozentige Lösung.

1. Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung . . . = 0,17125 mm.
 - - - Osmiumsäure 1 pCt. = 0,172 -
 Volumen in NaCl-Lösung = 0,0026272 cmm.
 - - - Osmiumsäure = 0,0026644 -
 Zunahme in Osmiumsäure = 0,0000372 -
2. Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung . . . = 0,1395 mm.
 - - - Osmiumsäure 1 pCt. = 0,1416 -
 Volumen in physiolog. Kochsalzlösung = 0,0014183 cmm.
 - - - Osmiumsäure 1 pCt. . . . = 0,0014865 -
 Zunahme in Osmiumsäure = 0,0000682 -

3. Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung . . .	= 0,1492 mm.
- - - Osmiumsäure 1 pCt.	= 0,161 -
Volumen in NaCl-Lösung	= 0,001739 cmm.
- - - Osmiumsäure 1 pCt. . .	= 0,002182 -
Zunahme in Osmiumsäure	= 0,000448 -

Die Osmiumsäure ist überhaupt als Fixationsmittel für zarte Objecte wie Eizellen am meisten geeignet und zu empfehlen. Neben geringfügigeren Größenveränderungen bleiben die Formen und Contouren mit grosser Schärfe erhalten. Ausserdem ist die schnelle Wirkung, welche an der Schwärzung der Dotterkugeln leicht zu controliren ist, ein nicht zu unterschätzender Vortheil. Da ferner die Osmiumsäure nicht mit dem Eiweiss der Zellen gewebeähnliche Niederschläge bildet, so entspricht auch die innere Strukturanordnung am meisten der frischen Objecte.

Gegen Blut verhält sich 1 prozentige Osmiumsäure jedoch anders.

Für das Froschblut ist sie sehr ungeeignet. Die regelmässigen Formen sind Ausnahmen und finden sich meist nur da, wo dichte Massen von Blutkörperchen zusammenliegen, so dass die Vermuthung nahe liegt, dass hier die Lösung nicht ihre volle Wirkung entfaltet hat. Es finden sich Blutkörperchen, die kaum 0,5 der Grösse der anderen haben und ganz rund sind; ebenso auch die Kerne. Bei den anderen sind die Kerne der Form nach erhalten, aber granulirt. Sonst findet man hutförmige Blutscheiben und solche, die die Saturnform darbieten. Etwa der fünfte Theil ist ganz entfärbt. Andere sind halb entfärbt und halb nicht. Die Farbe ist im Allgemeinen etwas blasser als beim frischen Blute. Das Hämoglobin ist häufig ausgetreten. Wegen der unregelmässigen Form wurden Messungen nicht gemacht.

Ebenso wenig erhält man bei Taubenblut halbwegs brauchbare Resultate.

Kaninchen. Die Scheiben sind blass, aber gut erhalten, das Hämoglobin ist gefällt und theilweise ausgetreten, die Contour sehr deutlich.

$$D = 5,41 \pm 0,05 \mu.$$

Mensch. Es zeigen sich dieselben Erscheinungen wie bei Kaninchenblut; auch in diesen Fällen erscheint der deutliche Rand bemerkenswerth.

$$D = 7,12 \pm 0,046 \mu;$$

gegen frisches Blut also ein Verlust von $0,76 \mu$.

Die Pikrinsäure in gesättigter wässriger Lösung ist für zarte Zellen überhaupt nicht zu brauchen. Die äussere Form wird durch ihre Anwendung stets zerstört. Besser erhält die Kleinenberg'sche Pikrinschwefelsäure Form und Contouren, obgleich uns über ihre Wirkung nur geringe Erfahrungen zustehen.

Zusammensetzung der Kleinenberg'schen Pikrinschwefelsäure:

Acidi pikronitr. (ges. wässrige Lösung) 50 ccm

Acidi sulfuric. 1,0 -

Das Filtrat wird verdünnt mit Aq. dest. 150 -

Mittl. Durchm. in NaCl-Lösung = 0,1446 mm.

- - - - - Pikrinschwefelsäure = 0,1454 -

Volumen in physiolog. Kochsalzlösung = 0,0015831 cmm.

- - - - - Pikrinschwefelsäure = 0,0016094 -

Zunahme = 0,0000263 -

Interessant ist, dass die Pikrinschwefelsäure auf das Ei als solches eine wenn auch geringe Quellung ausübt, auf die Zona pellucida dagegen stark schrumpfend wirkt.

Mittlerer Durchmesser in:

NaCl-Lösung (mit Zona pelluc. gemessen = 0,1626 mm.

Pikrinschwefelsäure = 0,1547 -

Der Inhalt der Zona ist in:

NaCl-Lösung = $\frac{4}{3} r^3 \pi - \frac{4}{3} \varrho^3 \pi = 0,0006678$ cmm.

Der Inhalt der Zona in:

Pikrinschwefelsäure = $\frac{4}{3} r_1^3 \pi - \frac{4}{3} \varrho_1^3 \pi = 0,0003254$ -

Schrumpfung der Zona = 0,0003424 -

Bei den Blutkörperchen kam diese Lösung nicht zur Verwendung.

Beim Alkohol kommt neben der Coagulation des Eiweisses noch die wasserentziehende Wirkung in Betracht. Die Schrumpfung in absolutem Alkohol ist eine so unregelmässige, dass wir von der Berechnung des mittleren Durchmessers absehen und die Maasse der vier Durchmesser einzeln anführen:

1. Durchm.	in NaCl-Lösung	in Alcohol absol.
aa	0,1406 mm	0,1081 mm
bb	0,1373 -	0,1007 -
cc	0,1373 -	0,1165 -
dd	0,1373 -	0,0957 -

2. Durchm.	in NaCl-Lösung	in Alcohol absolut.
aa	0,1433 mm	0,1296 mm
bb	0,1516 -	0,1254 -
cc	0,1453 -	0,1337 -
dd	0,1453 -	0,1171 -

Wird der Alkohol auf bereits vorher fixirte Objecte angewendet, dann findet zwar eine nicht viel geringere Schrumpfung statt, aber die Contouren bleiben viel besser erhalten.

1. Durchm.	in Flemming'scher Lös.	in Alcohol absolut.
aa	0,183 mm	0,1714 mm
bb	0,1809 -	0,1664 -
cc	0,1809 -	0,1622 -
dd	0,183 -	0,1685 -

2. Durchm.	in Flemming'scher Lös.	in Alcohol absolut.
aa	0,1447 mm	0,1248 mm
bb	0,1457 -	0,1310 -
cc	0,1457 -	0,1248 -
dd	0,1457 -	0,1227 -

Schliesslich wurden noch einige Versuche gemacht, um den Einfluss der Wasserentziehung auf die Blutkörperchen festzustellen. Zuerst wurden sie eingetrocknet. Diese Eintrocknung soll nicht zu schnell stattfinden; es genügt, bei Zimmertemperatur eine dünne Schicht Blut aufzutragen, am besten mit dem Rande eines schräg gehaltenen Deckglases und durch Hin- und Herbewegen die Eintrocknung zu beschleunigen.

Froschblut eignet sich wegen der Grösse seiner Elemente nicht zu dieser Methode der Conservirung und giebt sehr verschiedene Resultate.

Taubenblut. Langsam eingetrocknet:

$$\text{I. } L = 14,08 \pm 0,023 \mu \quad Q = 5,93 \pm 0,03 \mu.$$

Schnell eingetrocknet über der Flamme:

$$\text{II. } L = 13,81 \pm 0,058 \mu \quad Q = 5,64 \pm 0,053 \mu;$$

in Luft photographirt.

Also gegen frisches Blut bei langsamer Eintrocknung Verlust:

$$L - 1,31 \mu \quad Q + 0,06 \mu.$$

Bei rascher Eintrocknung:

$$L - 1,57 \mu \quad Q - 0,23 \mu.$$

Nun werden dieselben Präparate in Alcohol absolut fixirt und nach dem Trocknen nochmals photographirt; es ergab sich:

$$\text{I. } L = 14,41 \pm 0,04 \mu \quad Q = 6,53 \pm 0,03 \mu.$$

$$\text{II. } L = 13,85 \pm 0,05 \mu \quad Q = 5,55 \pm 0,04 \mu.$$

Während sich also die schnell eingetrockneten Blutkörperchen nicht mehr verändern, stellt sich für die anderen die merkwürdige Thatsache heraus, dass sie durch Alkohol grösser werden, und zwar:

$$L + 0,33 \mu \quad Q + 0,60 \mu.$$

Sodann wurden die Blutkörperchen, nachdem sie langsam eingetrocknet und mit absolutem Alkohol fixirt waren, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und in Luft untersucht:

$$L = 13,67 \mu \quad Q = 5,89 \mu.$$

Nach Einschluss in Canadabalsam erschien:

$$L = 13,60 \mu \quad Q = 5,64 \mu.$$

Durch die Färbung verliert also im Mittel:

$$L 1 \mu \text{ und } Q \text{ fast nichts.}$$

Die mittlere Grösse der lufttrockenen, in Alcohol absolut fixirten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Blutkörperchen ist:

$$L = 13,60 \pm 0,05 \mu \text{ und } Q = 5,79 \pm 0,04 \mu.$$

Verlust gegen frisches Blut:

$$L - 1,79 \mu \quad Q - 0,07 \mu.$$

Menschenblut eingetrocknet erhält seine Form gut, nur erscheinen die centralen Partien der Scheiben wellig.

$D = 7,54 \pm 0,05 \mu$. Also gegen frisch ein Verlust von $0,34 \mu$.

Fassen wir die Ergebnisse der Blutmessung nun kurz zusammen, so ergiebt sich:

1. dass (mit Ausnahme der physiologischen Kochsalzlösung für Froschblut) keines der angewendeten Mittel als indifferent gelten kann;

2. dass die als Fixationsmittel angewendeten Ingredienzien gröbere Struktur- und Formveränderungen hervorrufen;

3. dass bei den runden Blutscheiben von Kaninchen und Menschen die äussere Zone in ihrem Verhalten gegen Fixationsmittel verschieden ist von den centralen Partien.

Auf welche Ursache die Veränderungen der Dimensionen zurückzuführen sind, ist mit absoluter Sicherheit nicht zu sagen.

Fällung des Hämoglobins bewirkt nahezu proportional der Wirkung eine Verkleinerung der Durchmesser. Die Quellung in Kochsalzlösung beruht wohl auf Wasseraufnahme der Eiweisskörper des Blutkörperchens. Entgegengesetzt bewirkt Wasserentziehung eine Verkleinerung. Interessant ist das physikalische Verhalten der elliptischen Blutkörperchen in solchen Flüssigkeiten, welche das Hämoglobin niederschlagen und coaguliren, wie Flemming'sche Lösung und Osmiumsäure.

Sobald dies der Fall ist, werden sie fast rund. Eine Erklärung dafür wäre die folgende: Die Membran dieser rothen Blutkörperchen ist das eigentliche elastische Element. Auf sie wird durch den Inhalt ein gewisser Gegendruck geleistet. Lässt dieser nach, so überwiegt die Elasticität der Membran und sie nimmt eine mehr kugelige Form an. Genaueres lässt sich zur Zeit noch nicht sagen; aber vielleicht ist auf diesem Wege Aufschluss darüber zu erlangen, warum die so difficilen Blutkörperchen im Körper stets ihre Form behalten und warum sie eine constante Form haben. Einen geeigneten Angriffspunkt dürften die pathologischen Formen bieten.

Ueberblicken wir die gewonnenen Resultate, so sind sie allerdings nur eine Reihe empirisch erlangter Thatsachen. Aber sie sind eben erst der Anfang weiterer Untersuchungen auf diesem bis jetzt noch wenig gepflegten Gebiete. Wir möchten zudem vor der Einseitigkeit warnen, die verschiedenen Grössenveränderungen verschiedener histologischer Objecte durch die betreffenden Zusatzflüssigkeiten einzige und allein auf chemische Differenzen zu beziehen, sondern wir betrachten die abweichende Einwirkungsweise als Componente vieler wichtiger Factoren, welche allerdings bis jetzt unserm Einblick noch zum grossen Theil verschlossen sind. So kommt beispielsweise bei der Wirkung der Reagentien auf rothe Blutkörperchen und Eizellen neben den allerdings sehr grossen Differenzen chemischer Natur unter Anderem auch der Umstand in Betracht, dass die rothen Blutkörperchen mit einer zu ihrem Inhalt relativ sehr grossen Oberfläche dem betreffenden Reagens ausgesetzt sind, mit einer relativ kleinen die Eizellen, wodurch nothwendigerweise der zeitliche Gang der Einwirkung, vielleicht auch das Gesamtergebniss beeinflusst wird. Ueberhaupt ist die körperliche Be-

trachtung wohl geeignet, noch manchen Aufschluss über die Form und Struktur der histologischen Objecte zu geben. Eine Eizelle als eine fast völlige Kugel hat bei geringster Oberfläche den möglichst grössten Inhalt, eine Leberzelle beispielsweise eine im Vergleich mit ihrem Inhalt relativ viel grössere Oberfläche. Und da wir gewohnt sind, in allen solchen Erscheinungen ein Gesetz zu sehen, und da die teleologische Be trachtung einen wichtigen Factor in der naturwissenschaftlichen Beobachtungsweise darstellt, so dürften auch solche Erfahrungen eine gerechte Würdigung beanspruchen.

Zum Schlusse möchten wir den Wunsch aussprechen, dass diese kurze Mittheilung auch bewährtere Kräfte wieder veranlassen möge, ohne künstliche Färbungen an die Untersuchung der thierischen Zellen heranzutreten. Anstatt künstliche möglichst indifferenten Flüssigkeiten zu erfinden ist es vielleicht ratsamer, die Wirkung möglichst einfacher und daher leichter zu beurtheilender Reagentien zu studiren.

Herrn Geheimrath Prof. Dr. R. Virchow sprechen wir für die bereitwillige Ueberlassung des Arbeitsplatzes im pathologischen Institut der Kgl. Charité unseren herzlichsten Dank aus. Nicht geringeren Dank schulden wir Herrn Prof. Dr. O. Israel, der nicht nur die Anregung zu vorliegender Arbeit gegeben hat, sondern auch durch Rath und That uns unterstützte.
