

**Virchows Archiv**  
für  
**pathologische Anatomie und Physiologie**  
und für  
**klinische Medizin.**

Band 179. (Siebzehnte Folge Bd. IX.) Heft 2.

---

**X.**

**Ultramikroskopische Untersuchungen.**

(Aus der 1. medizinischen Klinik der Kgl. Charité in Berlin, Abteilung  
für Krebsforschung.)

Von

Privatdozent Dr. L. Michaelis, Assistenten.

(Hierzu Taf. VI.)

---

I. Das Verhalten von Farbstofflösungen.

Durch die von Siedentopf und Szigmondy erfundene Beleuchtungseinrichtung, für die sich im Zusammenhange mit dem dazu gehörigen Mikroskop der Name Ultramikroskop einzubürgern anfängt, ist der Mikroskopie eine neue Methode erschlossen worden, um Teilchen sichtbar zu machen, deren Größe weit unter derjenigen liegt, welche Abbé und Helmholtz aus optischen Gründen für die unterste Grenze der mikroskopisch zur Abbildung zu bringenden Teilchen hielten. Und in der Tat handelt es sich ja beim Ultramikroskop auch nicht um die Abbildung der Teilchen, sondern nur um die Erzeugung eines seinem Wesen nach stets gleichen und von der wahren Form der ultramikroskopischen Teilchen unabhängigen Lichtindrucks. Deshalb kann auch das eigentliche Feld der Ultramikroskopie nicht das Studium der gewöhnlichen histologischen Objekte sein, sondern zunächst die Suspension kleinster Teilchen in einem homogenen Medium. So war auch das erste Objekt, mit dem die Erfinder des Apparates arbeiteten, das Goldrubinglas, bei welchem das homogene Medium durch das

Glas, die feinsten Teilchen durch Partikelchen von metallischem Gold repräsentiert werden. Es liegt nun von vorneherein sehr nahe, die Methode zum Studium der kolloidalen Lösungen anzuwenden, da man allen Grund hat, diese als Suspension feinsten Teilchen in einem homogenen Medium zu betrachten; und in der Tat haben Siedentopf und Szigmondy ihre Untersuchungen auch auf solche kolloidalen Lösungen erstreckt und zwar zunächst auf die kolloidale Lösung des Goldes in Wasser. Auch hierin konnten sie feinste Goldteilchen erkennen, welche mit dem gewöhnlichen Mikroskop nicht zu beobachten sind.

Damit man kleinste Teilchen in dem homogenen Medium mit dem Ultramikroskop zur Erscheinung bringen kann, ist es notwendig, daß die Teilchen irgend eine optische Differenz gegen dieses Medium besitzen, sei es im Brechungsexponenten, sei es in der Farbe. Die größten Farbdifferenzen zeigen nun die Farbstoffe selbst, deren wässrige Lösungen zu einem großen Teil eher den kolloidalen, als den echten Lösungen ähneln. Von besonderem Interesse erschienen deshalb Siedentopf und Szigmondy die fluoreszierenden Farbstoffe, weil bei ihnen die Eigenschaft der Lichtzerstreuung in einem ganz besonders hohen Maße ausgebildet ist, denn die Erscheinung der Fluoreszenz beruht darauf, daß die Lösung solcher Farbstoffe Licht von einer für jeden Farbstoff charakteristischen Wellenlänge zerstreut. Ebenso wie ein Kegel von Sonnenlicht in einer Eiweißlösung hell aufleuchtet, so tut er es auch in der Lösung eines fluoreszierenden Farbstoffes, nur daß bei letzterem die Farbe des zerstreuten Lichtes stets die gleiche ist, während sie bei der Eiweißlösung einfach von der Natur des einfallenden Lichtes abhängt. Es liegt demnach die Vermutung nahe, daß ebenso wie beim Goldrubinglas auch beim Fluoreszein und beim Eiweiß die lichtzerstreuende Eigenschaft auf dem Vorhandensein kleinster Partikelchen beruht. Ein Unterschied des Lichtkegels bei dem fluoreszierenden Körper und dem Eiweißkörper besteht nur darin, daß der letztere polarisiertes Licht aussendet, der erstere nicht.

Nimmt man daher als erstes Objekt der Untersuchung die Lösung eines fluoreszierenden Farbstoffes, z. B. des Fluoreszein, zur Betrachtung mit dem Ultramikroskop, was Siedentopf und

Szigmondy schon getan haben, so beobachtet man folgendes: Bei Lösungen mittlerer Konzentration, also z. B. 1 : 10000, sieht man einen prachtvoll hellgrün aufleuchtenden Lichtkegel, ohne daß man eine Inhomogenität in ihm entdecken könnte. Die Ursache davon ist offenbar die, daß die einzelnen Teilchen, an denen das Licht zerstreut wird, bei dieser Konzentration noch so dicht beieinander liegen, daß das Mikroskop sie nicht auflöst, entsprechend dem Abbé-Helmholtzschen Gesetz. Man muß demnach annehmen, daß man durch weiteres Verdünnen der Lösung schließlich zu einem Punkte kommt, wo die Teilchen so weit auseinander liegen, daß man sie einzeln erkennen kann. Wenn man nun Fluoreszein immer mehr verdünnt, so sieht man, wie schon Siedentopf und Szigmondy gefunden haben selbst bei einer Verdünnung von 1:100000000 noch ein leichtes Aufleuchten des Lichtkegels, ohne daß man imstande wäre, eine Inhomogenität zu entdecken. Verdünnt man noch weiter, so sieht man schließlich gar nichts mehr. Der erwartete Punkt also, den wir zu erreichen hofften, wo die diffuse Fluoreszenz sich körnig auflösen würde, ist nicht eingetreten. Wahrscheinlich sind die lichtzerstreuenden Fluoreszeinteilchen so klein und daher das von jedem einzelnen Teilchen zerstreute Licht ist so schwach, daß man bei der richtigen Verdünnung von den einzelnen Teilchen überhaupt nichts mehr sieht und man erst dann einen Lichteindruck erhält, wenn die Teilchen in so großen Mengen beisammen sind, daß dann das Mikroskop sie nicht mehr auflösen kann. Wir bedürften also einer Lichtquelle von viel größerer spezifischer Lichtintensität als die Sonne oder gar die elektrische Bogenlampe, um das Fluoreszein bei der entsprechenden Verdünnung als körnig zu erkennen.

Diese Beobachtungen waren nun der Ausgangspunkt für eine systematische Untersuchung der Farbstofflösungen überhaupt. Es zeigte sich, daß durchaus nicht alle Farbstoffe sich so verhalten wie Fluoreszein. Ich möchte die Farbstoffe nach ihrem optischen Verhalten in drei Gruppen einteilen, aus deren ich jeder nur einzelne Typen beschreiben will.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Anmerkung bei der Korrektur: Raehlmann (Physikal. Ztschr., IV,

Besser aber als die Farbstoffe in jene drei Klassen einzuteilen, ist es, die Farbstofflösungen einzuteilen, da, wie wir sehen werden, ein und derselbe Farbstoff je nach dem Lösungsmittel oder den sonstigen näheren Nebenumständen zu jedem der drei Typen gehören kann.

Zum ersten Typus gehören die Lösungen, wie ich sie eben an dem Beispiel der wässerigen Fluoreszeinlösung beschrieben habe. Ultramikroskopisch sind mit unseren bisherigen Beleuchtungsmitteln auf keiner Weise Inhomogenitäten zu erkennen, und wenn der Farbstoff fluoresziert, so ist auch diese Fluoreszenz nicht auflösbar. Hierhin gehören die wässerigen Lösungen des Eosin, Methylenblau, Toluidinblau, Thionin, Kresylviolett, Nilblau, Magdalarot, Pyronin. Es zeigt sich nun, daß einige von diesen Farbstoffen, deren wässrige Lösung bisher noch nicht als fluoreszierend bekannt ist, bei genügender Verdünnung bei der intensiven Beleuchtung im Strahlenkegel der Bogenlampe sowohl für das bloße Auge wie mit dem Ultramikroskop intensiv fluoreszieren; Methylenblau, Thionin, Toluidinblau, Nilblau, deren Lösungen sämtlich als nicht fluoreszierend gelten, fluoreszieren auf diese Weise in den verdünnten Lösungen mit einem prachtvollen Bordeauxrot.

Das entgegengesetzte Verhalten zeigt eine andere Gruppe von Farblösungen, welche sich im Ultramikroskop so verhalten, wie eine kolloidale Goldlösung, indem sie noch in den unglaublichsten Verdünnungen ultramikroskopisch in zahllose Teilchen auflösbar sind. Ich möchte zunächst einige von den Farbstoffen nennen, deren einfach wässrige Lösung dieses Verhalten zeigt, und beschränke mich dabei auf die Aufzählung einiger Farbstoffe: das wasserlösliche Indulin, das Violett-schwarz, das wasserlösliche Anilinblau und das ihm sehr nahe stehende Bayrischblau (alles sehr hochmolekulare Sulfosäuren).

In der Mitte zwischen diesen beiden Extremen steht nun eine große Anzahl von Farblösungen, bei denen man ultra-

Nr. 30, p. 884—890) hat auf Grund seiner Untersuchungen eine ähnliche Einteilung (in 4 Gruppen) schon vor mir aufgestellt. Seine in einer für Mediziner etwas fernliegenden Zeitschrift erschienene Arbeit wurde mir erst nach Absendung dieses Manuskriptes bekannt.

mikroskopisch zwar eine Inhomogenität in Form von kleinen Partikeln erkennen kann, bei denen jedoch die Partikel ihrer Masse nach nicht ausreichen, um den gesamten Farbstoffgehalt der Lösung zu erklären. Diese Farblösungen enthalten also den Farbstoff in zwei „Phasen“. Ein Teil des Farbstoffes befindet sich in optisch nicht auflösbarer homogener Form, ein anderer in Form der Suspension auflösbarer Teilchen. Einige von diesen Farbstoffen zeigen schon in hohen Verdünnungen eine beträchtliche Anzahl von Körnchen, andere erst bei stärkeren Konzentrationen. Hierzu gehören Fuchsin, Methylviolett, Neutralrot, Capriblau, Pikrinsäure. Anfänglich glaubte ich, daß die in den dünnen Lösungen dieser Farbstoffe im Verhältnis zu den Erscheinungen der Farbstoffe der vorhin beschriebenen Farbenklasse nur spärlich sichtbaren Körnchen eine Verunreinigung darstellten, denn es ist schwer zu vermeiden, irgend eine noch so klare Flüssigkeit herzustellen, bei der nicht gelegentlich das Ultramikroskop einmal ein leuchtendes Teilchen erkennen ließe, und von dessen Natur wir natürlich nichts aussagen können, ebenso wie ein gewöhnliches mikroskopisches Präparat hier und da einmal ein undefinierbares Staubeilchen zeigen kann. Aber bei diesen Farblösungen finden sich die Teilchen doch stets hierfür zu reichlich und zu regelmäßig, so daß sie zweifellos einen integrierenden Bestandteil der Farblösung darstellen. Eine Fuchsinlösung 1 : 10000, welche schon sehr intensiv rot gefärbt ist, zeigt nur spärliche Körnchen; erst bei 1 : 1000 sind sie ziemlich zahlreich.

Die total auflösbaren und die partiell auflösbaren Farblösungen sind natürlich durch alle Übergänge verbunden, und es kann die Entscheidung, zu welcher der beiden Klassen eine Lösung gehört, mitunter schwierig sein. Das liegt in der Natur der Sache.

Betrachten wir nun die färberischen Eigenschaften dieser drei Farblösungen und versuchen diese in Zusammenhang mit ihrem optischen Verhalten zu bringen (ich bezeichne also im folgenden die völlig homogenen Farblösungen als die der ersten Klasse, die teilweise auflösbaren als die der zweiten und die völlig auflösbaren als die der dritten Klasse), so fällt uns auf, daß die Farbstoffe der dritten Klasse in hohem Maße die

Eigentümlichkeit zeigen, diffus zu färben; während im allgemeinen die sauren Farbstoffe eine auffällig geringe Affinität zu den Zellkernen haben, namentlich im hitzefixierten Trockenpräparat, sind es gerade die Farbstoffe der dritten Klasse, welche davon eine Ausnahme machen. Sie färben völlig diffus, selbst im Trockenpräparat, geschweige denn im Paraffinschnitt auch die Zellkerne mit, so daß schon Ehrlich eine Kombination dreier saurer Farbstoffe herstellte, bei denen das Indulin die Rolle des Kernfarbstoffes spielt. Die Farbstoffe der ersten Klasse hingegen sind diejenigen, welche im Sinne ihrer chemischen Konstitution am distinktesten färben. Die sauren unter ihnen haben eine ausgesprochen geringe Affinität zu den Kernen (Eosin), die basischen unter ihnen sind in genügend verdünnter Lösung die reinsten Kernfarbstoffe, wenn auch graduell verschieden, aber jedenfalls alle reinere Kernfarbstoffe als die nunmehr folgenden Farbstoffe, deren wässrige Lösungen der zweiten Klasse angehören. Sie haben schon wieder eine ausgesprochene Neigung zur Diffusität (Fuchsin und Methylviolett). Man denke z. B. an Abstrichpräparate irgend welcher eiweißhaltigen Körperflüssigkeit, Sputum, Exsudate usw., und vergleiche das saubere Bild der Thionin- oder Methylenblaufärbungen mit dem diffusen Bilde einer Fuchsin- oder Methylviolettärbung. Ich möchte jedoch diese Regel nicht als strenges Gesetz aufstellen, da es auch Ausnahmen gibt; z. B. die recht distinkt färbende Pikrinsäure ist, wenigstens in höheren Konzentrationen, partiell optisch auflösbar. Trotzdem bleibt als Regel bestehen, daß diejenigen Farbstoffe, welche an sich Neigung haben, in körniger Form aufzutreten, gerade diejenigen sind, welche am leichtesten und in am wenigsten spezifischer Weise von allen möglichen organischen Substraten adsorbiert werden.

Bisher sprach ich nur von den rein wässrigen Lösungen der Farbstoffe, hatte aber schon bemerkt, daß ein und derselbe Farbstoff je nach der Verdünnung und dem Lösungsmittel bald der einen, bald der anderen Gruppe angehören kann. Ich möchte hierfür einige Beispiele geben. Das Fuchsin gehört in einfach wässriger Lösung der zweiten Gruppe an. Nun hat bekanntlich Ehrlich gefunden, daß die Farbkräftigkeit und damit Hand in Hand gehend die Diffusität der Färbung beim

Fuchsin durch einen Zusatz von Anilin und dergleichen Stoffen erhöht wird, so daß man zur Färbung schwer färbbarer Objekte wie der Tuberkelbazillen nur solche mit Anilin usw. versetzten Farbstofflösungen der zweiten Klasse verwendet. Wenn es nun wahr ist, daß der Grad der optischen Auflösbarkeit des Farbstoffes mit der Diffusität seiner Färbung in einem Zusammenhang steht, so müßte man annehmen, daß der Anilinzusatz möglicherweise einen Einfluß auf die optische Auflösbarkeit hat. Diese Vermutung fand ich nun vollauf bestätigt. Während nämlich, wie gesagt, eine einfach wässrige, stark verdünnte Fuchsinlösung nur relativ wenige Körnchen ultramikroskopisch zeigt, ist eine ebenso stark verdünnte Fuchsinlösung in Anilinwasser optisch vollkommen auflösbar und bietet genau denselben Anblick dar wie etwa ein gröberes Goldrubinglas. Die Bezeichnung „Schwebefällung“ (Unna) für derartige Lösungen erweist sich also mit der neuen mikroskopischen Methodik als durchaus begründet.

Auch auf eine andere Weise kann man eine Fuchsinlösung aus der zweiten optischen Form in die dritte überführen, nämlich durch Zusatz einer sehr geringen Menge von Alkali. Besonders interessant ist aber auch wegen seines makroskopischen Verhaltens der Zusatz von Kochsalz unter gewissen Bedingungen. Ich schicke voraus, daß Fuchsin in wässriger Lösung durch Sättigung mit Kochsalz vollkommen ausgesalzen wird, daß sich aber in der Hitze das Fuchsin in der Kochsalzlösung wieder löst, um beim Erkalten wieder auszufallen. Wenn man nun eine dünne Fuchsinlösung unter Sieden mit Kochsalz sättigt und dann im Wasserstrahl abkühlt, so fällt das Fuchsin nicht aus, sondern zeigt ein merkwürdiges, so viel mir bekannt, bisher noch nicht beschriebenes Verhalten. Die Lösung wird nämlich im durchfallenden Licht je nach den Umständen rotviolett bis intensiv blau-violett oder fast cyanblau, während sie im auffallenden Licht die Fuchsinfärbung behält. Diese Erscheinung erinnert außerordentlich an die der gefärbten Goldsole, und in der Tat gleicht auch das ultramikroskopische Bild völlig einer solchen. Das Fuchsin ist in Form unendlich zahlreicher, optisch auflösbarer, ultramikroskopischer Körnchen in dieser Lösung enthalten. Eine derartige

Fuchsinlösung läßt gewöhnlich nach 24 Stunden den gesamten Farbstoff schließlich doch noch flockig ausfallen.

Scharlach R (s. dieses Archiv 164) ist in Wasser unlöslich, löst sich aber in Alkohol. Eine alkoholische Lösung dieses Farbstoffes zeigt nun keinerlei Inhomogenität, sondern nur eine ganz geringe rote diffuse Lichtzerstreuung, welche man aber unter die Fluoreszenzerscheinungen rechnen muß. Wenn man nun eine solche sehr dünne alkoholische Scharlachlösung mit etwa fünf Teilen Wasser verdünnt, so fällt der Farbstoff nicht aus, es ändert sich nur die Nuance insofern, als die Lösung im Vergleich zu der alkoholischen etwas schmutziger rot erscheint. Im Ultramikroskop zeigt diese Lösung nun wiederum vollkommene Auflösbarkeit in feinste Teilchen genau wie das Goldrubinglas.

Die wässrige Lösung des Nilblau gehört, wie schon erwähnt, zur ersten optischen Klasse. Durch Zusatz von Natronlauge wird aus einer konzentrierten Nilblaulösung die freie Farbbase als roter Niederschlag ausgeschieden. In einer sehr verdünnten Nilblaulösung dagegen tritt nur der Farbumschlag nach Rot ohne Niederschlagsbildung ein. Diese rote Flüssigkeit zeigt nun ultramikroskopisch vollkommene Auflösbarkeit. Man könnte nun meinen, daß der Farbumschlag des Nilblau allein dieser optischen Änderung seines Zustandes zuzuschreiben sei. Das ist aber nicht der Fall. Denn die gelbrote (in verdünnter Lösung mehr gelbe) Lösung der Nilblaubase in Xylol zeigt ultramikroskopisch nichts weiter als eine nicht auflösbare gelbe Fluoreszenz; der Farbumschlag allein bedingt also noch nicht die optische Auflösbarkeit.

## II. Das Verhalten der Farbstoffe in gefärbten Zellpräparaten.

Schon aus den Untersuchungen von Siedentopf und Szigmondy sowie von Raehlmann geht hervor, daß das Ultramikroskop nicht ohne weiteres zur Betrachtung größerer histologischer Objekte geeignet ist. Das liegt daran, daß überall statt scharfer Konturen mehrere Beugungsringe zu sehen sind und daher immer dann, wenn mehrere Konturen dicht beieinander liegen, die verschiedenen Beugungsringe sich überdecken



und ein unentwirrbares Netzwerk statt einfacher Linien geben. Ein sehr einfaches und demonstratives Beispiel für die Wirkung des Ultramikroskopes ist die Betrachtung eines roten Blutkörperchens. Man sieht um ein dunkles Zentrum einen ganzen Kranz konzentrischer Ringe. Viel kompliziertere Gebilde gibt schon z. B. ein gefärbter neutrophiler oder eosinophiler Leukocyt im gefärbten Präparat. Das hierbei entstehende Bild kann man sich leicht vergegenwärtigen, wenn man sich statt eines jeden Granulum eine Reihe konzentrischer Ringe um seinen eigentlichen Ort denkt. Die sich überkreuzenden Lichtringe geben ein völlig unentwirrbares flimmerndes Netzwerk von Licht und es bedarf schon einiger Erfahrung, um rückwärts aus diesem Lichtbild auf das Vorhandensein von Granulis in der Zelle zu schließen, und auch dann wird man über ihre eigentliche Form nichts aussagen können. Jedoch gibt es einzelne histologische Objekte, bei denen das Ultramikroskop auch gute Dienste leistet. Das sind solche Objekte, die sich in ihrem Wesen mehr den im ersten Teile betrachteten Suspensionen feinsten Körnchen in einem homogenen Medium nähern. Als hervorragend schönes Objekt für diesen Zweck fand ich die basophilen Granulationen der roten Blutkörperchen, welche bei verschiedenen Anämien auftreten. Es fanden sich hier in einem homogenen Medium des so gefärbten Protoplasma des roten Blutkörperchens einzelne Inhomogenitäten, eben jene Körnchen, welche meist genügend weit auseinander liegen, daß die Beugungsringe, die um jedes einzelne herum entstehen, sich nicht allzu sehr überdecken. Während nun bekanntlich diese Körnchen der roten Blutkörperchen selbst im gefärbten Präparat zu denjenigen Objekten gehören, welche mit guten Objektiven manchmal eben gerade nur noch auflösbar erscheinen (wenn es auch größere gibt) so bilden mit dem Ultramikroskop diese Körnchen geradezu Riesenobjekte dadurch, daß man nicht sie selbst sieht, sondern konzentrische Lichtringe um diejenige Stelle, an der sie eigentlich liegen. Ja, es gelingt sogar den Präparaten, in denen die Körnchen einigermaßen zahlreich sind, sie mitunter in solchen Blutkörperchen nachzuweisen, bei denen man sie mit dem gewöhnlichen Mikroskop gar nicht oder nur mit einiger Einbildung erkennen kann.

### III. Einige orientierende Bemerkungen über die Beeinflussung der Eigenfarbe durch das Ultramikroskop.

Unter vielen Bedingungen erscheinen gefärbte Objekte im Ultramikroskop nicht in der Nuance, in der wir sie makroskopisch oder im gewöhnlichen Mikroskop zu sehen gewohnt sind. Die allgemeinen Gesetze, nach denen die Farben durch das Ultramikroskop verändert werden, bedürfen wohl noch einer speziellen physikalischen Untersuchung. Nur zur vorläufigen Orientierung mögen die folgenden Bemerkungen dienen.

Farbstoffe, welche in wässriger Lösung fluoreszieren, scheinen immer in der Farbe der Fluoreszenz aufzutreten. Eosin ist immer gelbgrün, Methylenblau je nach der Intensität der Färbung gelbbrot bis kupferrot. Nicht fluoreszierende Farbstoffe, wie das Fuchsin, zeigen ein wechselndes Verhalten. Bei Anwendung der Abbéschen Zentralblende mit axialer Beleuchtung erscheint das Fuchsin gelbgrün bis grün, also in derselben Farbe, wie sie als Oberflächenfarbe bei den trockenen Kristallen des Farbstoffs auftritt. Bei größeren Objekten, z. B. großen Bakterienhaufen, ist gewöhnlich die Mitte rot, und nach dem Rande zu wird die Farbe allmählich grünlich-gelb. Dagegen erscheinen bei der senkrechten Beleuchtung und Anwendung der Siedentopfschen Cuvette die Teilchen einer Fuchsinlösung oder mit Fuchsin gefärbte Eiweißkörnchen rot. Jedoch ist zu bedenken, daß die von den Teilchen ausgesandten Lichtstrahlen bei der Anwendung der Cuvette immer noch eine Schicht der Farblösung zu durchlaufen haben, bevor sie ins Mikroskop gelangen, wodurch die Färbung eine Modifikation erleiden kann. Hierbei erscheinen dann auch mit Methylenblau gefärbte Eiweißteilchen blau. Manche, wie es scheint, die violetten Farbstoffe, zeigen in der Cuvette nicht eine einheitliche Farbe, sondern Körnchen von verschiedener Färbung (vgl. Indulin in der Tafel VI). Beim Indulin sieht man rote und lilafarbene Teilchen. Zu einem Teil erklärt sich das daraus, daß die Farbe je nach der Einstellung der Ebene etwas variiert, zum anderen Teil haben aber die Körnchen auch unter Berücksichtigung dieser Tatsache wirklich verschiedene Farben. Ob hier nun verschiedene chemische Individuen vorliegen, oder

ob es sich um eine rein optische Erscheinung handelt, vermag ich noch nicht zu entscheiden. Diese vorläufigen Bemerkungen mögen zunächst genügen, um auf die Schwierigkeit der Beurteilung der Eigenfarbe im Ultramikroskop aufmerksam zu machen.

#### IV. Über das Verhalten von Eiweißlösungen im Ultramikroskop.

Die oben mehrfach zitierten Autoren haben aus naheliegenden Gründen ihre Aufmerksamkeit sogleich den Eiweißlösungen verschiedener Art zugewendet. Ich möchte nun meine Erfahrungen über Eiweißlösungen mitteilen, welche sich mit denen von Raehlmann nur in einigen Punkten, mit denen von Römer, Much und Siebert<sup>1)</sup> nur wenig decken. Ich beschreibe zunächst die Tatsachen. Betrachtet man unverdünntes Blutserum im Ultramikroskop, so sieht man einen hell aufleuchtenden Lichtkegel, in dem man näheres nicht differenzieren kann. Bei einer Verdünnung von 1:10, besser noch 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung nimmt die Helligkeit, mit der diese Lichtkegel aufleuchten, ein wenig ab, dafür sieht man aber auf einem hellen Untergrund ziemlich zahlreiche, noch heller leuchtende Körnchen in regelmäßiger Verteilung sich abheben. Bei einer noch stärkeren Verdünnung von 1:1000 nimmt der diffus leuchtende Untergrund an Helligkeit immer mehr ab, während die einzeln sichtbaren Körnchen immer deutlicher hervortreten. Hierbei ist jedoch zu bemerken, daß die Anzahl der Körnchen bei 1000facher Verdünnung keineswegs zehnmal größer als bei 10000facher Verdünnung, sondern daß die Anzahl der sichtbaren Körnchen durchaus nicht proportional der Verdünnung abnimmt. Auch ist keineswegs daran zu denken, daß die bei der Verdünnung sichtbar werden den Körnchen allein die optische Auflösung des vorher diffusen Lichtkegels darstellen, denn zunächst bleibt neben den Körnchen der diffus leuchtende Untergrund noch bestehen.

Verdünnt man das Serum nicht mit physiologischer Kochsalzlösung, sondern mit destilliertem Wasser, so ist über den diffusen Untergrund zunächst dasselbe zu sagen, daneben aber

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physik.-diät. Ther. 1904, Mai- und Juniheft.

treten die auflösbaren Körnchen in viel stärkerem Maße hervor als bei der Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung. Bei weiterer Verdünnung werden sie nicht etwa weniger, sondern im Gegenteil zunächst bedeutend zahlreicher. So ist z. B. das Bild, welches eine 100fache Serumverdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung bietet, an Körnchenreichtum nicht im entferntesten zu vergleichen mit dem Bilde, das eine gleiche Verdünnung mit destilliertem Wasser bietet.

Eine durch Halbsättigung mit Ammonsulfat dargestellte Albuminlösung aus Blutserum zeigt verhältnismäßig recht wenig Körnchen, während eine künstlich dargestellte Globulinlösung, die an sich schon immer etwas opaleszent ist, ultramikroskopisch zahlreiche Körnchen von verschiedenster Helligkeit (d. h. also, da der Brechungsexponent der verschiedenen Eiweißteilchen als gleich angenommen werden kann, Größe) erkennen läßt.

Eine äußerst verdünnte Albuminlösung, welche nur noch sehr wenig Körnchen zeigt, bietet, wie übrigens schon Raehlmann beobachtet hat, nach dem Kochen ein ganz anderes Bild dar, indem sie von feinsten Körnchen wimmelt.

Wir kommen nunmehr zu der Deutung dieses Befundes und legen uns die Frage vor, zu welcher der drei eben angeführten Klassen eine Eiweißlösung gehört. Nach dem erwähnten Befunde ist es klar, daß wir sie nur der zweiten Klasse einreihen können, d. h. also den optisch partiell auflösbaren Lösungen. Das Eiweiß ist zunächst einmal in körniger Form vorhanden, daneben aber in einer Form, welche zwar bei höherer Eiweißkonzentration durch ein diffuses Aufleuchten des Lichtkegels eine Inhomogenität erkennen läßt, bei der aber selbst das Ultramikroskop in der heutigen Form eine optische Auflösung nicht zustande bringt. Diese Art der Inhomogenität ähnelt also der Fluoreszenz nur mit dem Unterschiede, daß eine Fluoreszenz bei hoher Verdünnung erst recht deutlich wird, während die Lichtzerstreuung der Eiweißlösung erst bei höheren Konzentrationen deutlich wird. Jedoch ist dieses abweichende Verhalten beider Lösungen für uns für die vorliegende Frage nicht von so großer Bedeutung und hängt offenbar nur mit der Tatsache zusammen, daß die fluoreszierenden Farbstoffe ein sehr viel höheres Lichtzerstreuungsvermögen haben als eine

Eiweißlösung; das Wesen eines fluoreszierenden Stoffes ist es gerade, an seinen kleinsten Teilchen einen großen Teil des auf ihn fallenden Lichtes in einer — ich möchte sagen — spezifischen Weise zu zerstreuen, während die Eiweißlösung keinen spezifischen Einfluß auf das Licht hat, sondern wohl nur infolge ihrer feinkörnigen, wenn auch selbst ultramikroskopisch nicht auflösbaren Struktur aus allgemein optischen Gründen dieses Lichtzerstreuungsvermögen zukommt. In stark verdünnten Eiweißlösungen wird diese Lichtzerstreuung so gering, daß man von ihr wenig oder nichts mehr sieht.

In jeder Eiweißlösung ist also das Eiweiß in zwei verschiedenen Zustandsphasen enthalten, erstens in auflösbarer Form, zweitens als unauflösbare Trübung. Ob es zu einem dritten Teil nicht in noch feinerer Form enthalten ist, derart, daß etwa zwischen den hypothetischen feinsten Körnchen, aus welchen sich die unauflösbare Trübung zusammensetzen muß, noch feinere Teilchen enthalten sind, welche gar keine optische Erscheinung machen, wie etwa die Moleküle irgend eines Salzes in wässriger Lösung, von denen das Ultramikroskop gar nichts zeigt, ist zurzeit noch nicht zu entscheiden. Möglich ist es, daß die hypothetischen Körnchen der nicht auflösbaren Trübung schon die Eiweißmoleküle selbst sind, aber sicher ist, daß die optisch auflösbaren Körnchen nicht die Moleküle sind, sondern nichts weiter darstellen als den ersten Anfang einer Ausflockungserscheinung. Alles, was eine Ausflockung im Serum hervorruft, wie destilliertes Wasser oder Kochen, vermehrt die optisch auflösbaren Körnchen der Eiweißlösung, nur daß man natürlich ultramikroskopisch die Vermehrung schon früher nachweisen kann, als man makroskopisch Flocken erkennen kann. Es sei noch darauf hingewiesen, daß eine wässrige Lösung von Fuchsin in ihrem optischen Verhalten eine große Ähnlichkeit mit einer Eiweißlösung zeigt, nur daß vom Eiweiß ein relativ größerer Anteil in Form von Körnchen vorhanden zu sein pflegt als vom Fuchsin in einfach wässriger Lösung. Ich möchte auch daran erinnern, daß auf ganz anderem Wege Siedentopf und Szigmondy zu der Anschauung gelangten, daß die optisch auflösbaren Goldteilchen des Goldrubinglases nicht die Gesamtmasse des in dem Glase enthaltenen Goldes

darstellen kann, sondern daß ein Teil des Goldes in einer überhaupt nicht sichtbaren Form in dem Glase enthalten ist.

Aus den soeben entwickelten Anschauungen über die Natur einer Eiweißlösung folgt ohne weiteres, daß die von Römer, Much und Siebert beschriebene Methode der quantitativen Eiweißbestimmung auf ultramikroskopischem Wege in ihrer Allgemeinheit nicht zu halten ist. Sie berechnen für verschiedene Eiweißlösungen gewisse Zahlen, welche angeben, bei wievielfacher Verdünnung im Gesichtsfeld nur noch drei bis vier Eiweißteilchen vorhanden sind. Nun läßt ja aber eine Eiweißlösung von genau der gleichen Konzentration, je nachdem sie z. B. in physiologischer Kochsalzlösung oder in destilliertem Wasser gelöst ist, ganz enorme Unterschiede der Körnchenzahl erkennen. Die Autoren gehen so weit, zu behaupten, daß das Ultramikroskop für die Eiweißbestimmung ebenso wertvoll sei wie der Polarisationsapparat für die Zuckerbestimmung. Davon ist natürlich gar keine Rede. Es soll nicht geleugnet werden, daß für manche praktischen Fälle, z. B. für die Eiweißbestimmung des Harns, wo wir annähernd immer eine gleiche Salzkonzentration haben und immer mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnen können, praktisch ganz gut vergleichbare Resultate erzielt werden können, jedoch scheint mir diese Methode keine erhebliche Bereicherung der quantitativen Eiweißanalyse zu sein, da sie von so vielen Bedingungen abhängig ist.

#### Erklärung der Abbildungen auf Taf. VI.

Fig. 1. a Wässrige Lösung von Fuchsin 1:1000, b oben: wässrige Lösung von Fuchsin 1:10000, unten: dasselbe in Anilinwasser statt destillierten Wassers. c oben: wässrige Methylenblaulösung 1:10000, unten: wässrige Indulinlösung 1:10000, d klare Ascitesflüssigkeit, 200fach verdünnt, und zwar oben: mit 0,85 %  $\text{ClNa}$ -Lösung verdünnt, unten: mit destilliertem Wasser verdünnt.

Fig. 1 sämtliche Bilder mit Cuvette und senkrechter Beleuchtung. Spaltbreite in allen 0,1 mm, nur bei der Methylenblaulösung Spaltbreite 0,3 mm, um die Farbkraftigkeit zu erhöhen.

Fig. 2. a Mikroskopisches Bild. b Ultramikroskopisches Bild desselben Objektes bei derselben Vergrößerung (Zeiß Apochr. 2 mm, mit Abbe'scher Zentralblende, Kompensationsokular 18). Methylenblau-Eosin.

Drei rote Blutkörperchen, 1 Lymphocyt, 1 eosinophiler Leukocyt, 2 punktierte rote Blutkörperchen von perniziöser Anämie.

Fig. 1.

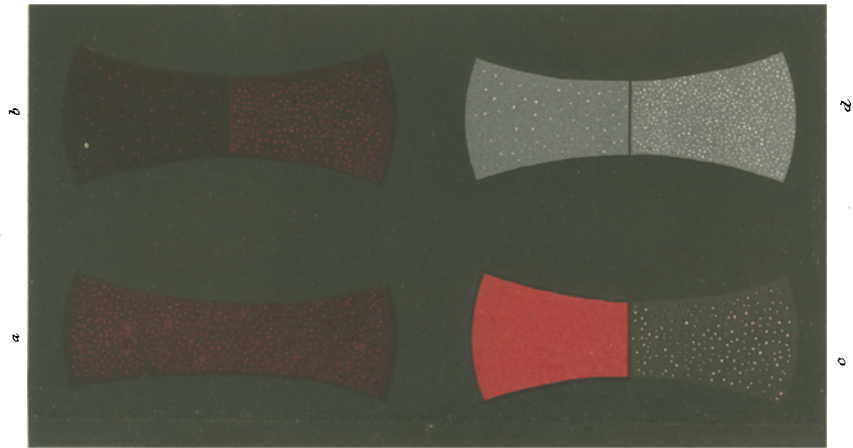


Fig. 2.

