

Method unter www.biologiezentrum.at

METHODEN FÜR DIE KOLORIMETRIE UND PHOTOMETRIE MIKROSKOPISCHER PRÄPARATE

Von PROF. DR. MAFFO VIALLI und DR. MARCO REGGIANI
(Institut für vergleichende Anatomie an der Universität Pavia; Leiter Prof. Maffo Vialli)

Die geringe Zahl von Versuchen, die Histochemie vom qualitativen auf das quantitative Gebiet überzuleiten, ist wenigstens zum Teil durch die Schwierigkeit, die notwendigen Messungen durchzuführen, bedingt. Die Grenzen der Präzisionstechnik, welche von CASPERSSON beim Studium der Nukleinsäuren mittels der Absorptionen im Ultraviolett erreicht wurden, können wohl auch im sichtbaren Licht erreicht werden, besonders durch Zuhilfenahme stöchiometrischer Färbungen, wie dies z. B. HYDÉN getan hat. Diese Technik erfordert aber nicht nur eine Ausrüstung mit besonderen Spezialinstrumenten, sondern auch große Geschicklichkeit, welche nur wenigen Spezialisten eigen ist.

Will man aber nicht gerade bis an die äußersten Grenzen einer topographischen Bestimmung gehen, wie sie durch CASPERSSONs Methoden erreicht wurden, so kann man seine Zuflucht auch zu Techniken nehmen, die — wohl weniger präzise — immerhin doch hinreichend genaue Resultate in den meisten Fällen gewährleisten.

Wir glauben in der Lage zu sein, eine Vorrichtung empfehlen zu können, welche für fast alle histologischen Laboratorien zugänglich und außerdem sehr einfach zu bedienen ist. Die Einrichtung besteht im wesentlichen aus einem Vergleichsokular, das heißt einem Okular, welches die gleichzeitige Betrachtung zweier mikroskopischer Präparate gestattet, von denen jedes in einer Hälfte des Gesichtsfeldes des Okulars sichtbar ist. Solche Okulare, welche von allen bekannteren Mikroskopherstellern hergestellt werden, finden in der Industrie bereits weitgehende Verwendung, haben aber bisher in der Histologie nur wenig Beachtung gefunden. Mit einem solchen Okular ist es aber nicht nur möglich, die Formenverschiedenheiten, sondern auch den verschiedenen Färbungsgrad von zwei Präparaten zu vergleichen. Für derartige Zwecke haben sich auch MARZA und CHIOSA und KELLEY eines solchen Okulars bedient. DEMPSEY, WISLOCKI und SINGER haben im Bestreben, vom einfachen Vergleich zweier Präparate zu quantitativen Untersuchungen überzugehen, dieses Okular statt an zwei Mikroskopen an einem Mikroskop und an einem DUBOSCQ-Kolorimeter angebracht. Die Intensität der Färbung eines Präparates wird dabei errechnet aus der Dicke einer Farblösung bekannter Konzentration, welche das Vergleichsfeld im Kolorimeter in Übereinstimmung mit jenem Präparatteil bringt, dessen Absorptionsgrad man messen will. Ähnliches kann man auch mittels anderer Instrumente erzielen, welche einige Erzeugerfirmen bereits seit einiger Zeit auf den Markt gebracht haben, wie z. B. das Photometerokular nach HASCHEK-HAITINGER von REICHERT oder das Photometermikroskop von LEITZ. Mit

Hilfe dieser Instrumente, welche bei quantitativen histologischen Untersuchungen bereits angewandt wurden, kann man den absoluten Wert der Absorption eines bestimmten Präparateiles messen.

Wir haben die Vorrichtung, mit deren Hilfe DEMPSEY, WISLOCKY und SINGER die Untersuchungen mit dem Vergleichsokular quantitativ durchführten, so abgeändert, daß unser Instrument einen größeren Aktionsradius für die Durchführung nicht nur histologischer, sondern auch mikrochemischer Messungen gewinnt. Die quantitative Bestimmung in diesem von uns entwickelten Gerät gründet sich auf das Gesetz, welches die Lichtdämpfung beim Durchgang durch zwei Polarisationsprismen regelt; es wird auch in einigen Photometern angewandt und gleicherweise im Photometerkopf des Photometermikroskops von LEITZ verwendet. Das bezügliche Gesetz lautet als Formel:

$$I' = I \cos^2 \alpha,$$

wobei I das eintretende Licht, I' das durchtretende Licht und α den Winkel zwischen den beiden Prismen bezeichnet. Setzt man nun $I = 1$, so wird der Wert von I' durch $\cos^2 \alpha$ ausgedrückt, was genügt, da es sich ja nur darum handelt, Prozentsätze anzugeben.

Die von uns benützte Vorrichtung kann entweder in Verbindung mit zwei Polarisationsmikroskopen oder mit einem Polarisationsmikroskop und mit einem gewöhnlichen Mikroskop verwendet werden. Die erste Type des Instrumentes wurde von uns in einem kürzlich erschienenen Aufsatz beschrieben, in welchem wir auch die zweite Type kurz skizzierten. Über diese wollen wir hier — neben der ersten Type — vor allem deswegen berichten, weil sie wegen ihrer Einfachheit leichter anwendbar sein dürfte. Die zwei Polarisationsmikroskope bzw. das eine Polarisationsmikroskop müssen drehbare Analysatoren haben, welche mit Einteilungen versehen sind, um die Ablesung des Winkels α zu ermöglichen. Für den Fall, daß die Skala nur von 5° zu 5° geteilt ist, wie dies bei vielen Instrumenten der Fall ist, kann man leicht noch eine Hilfsteilung, eingeteilt in $\frac{1}{1}^\circ$ oder $\frac{1}{2}^\circ$, anbringen. Die Beleuchtung der beiden Mikroskope wird von uns durch eine einzige Lichtquelle bewirkt, deren Licht durch zwei kleine Spiegel geteilt wird. Man soll mit genauer Einstellung von Lampe, Spiegeln und Apertur der Irisblende die beiden mikroskopischen Felder — ohne Präparate (!) — mit gleicher Intensität beleuchten. Um eine ganz übereinstimmende Intensität zu erzielen, kann man auch die beiden Polarisatoren entsprechend einstellen, was dann bei der Auswertung natürlich entsprechend berücksichtigt werden muß.

Wenn man zwei Polarisationsmikroskope benützt, braucht man nur das Polarisationsprisma zu drehen, das sich in jenem Mikroskop befindet, unter welchem das hellere Präparat sich befindet, und zwar so lange, bis man gleich starke Beleuchtung erreicht. Das Quadrat des Cosinus des abgelesenen Winkels gibt sofort die gewünschte Angabe, d. h. es zeigt an, um wie viele Prozente mehr Licht der untersuchte Präparateil gegenüber dem Musterpräparat absorbiert. Mit geringen Mitteln lassen sich ebenso gute Resultate auch mit nur einem Polarisationsmikroskop erreichen.

Je nach dem zu untersuchenden Fall geht man in verschiedener Weise vor, jeweils unter Berücksichtigung der besonderen Eigentümlichkeiten des Präparates und der zur Verfügung stehenden Lichtmenge. Nehmen wir beispielsweise den Fall, die Ablesungen der beiden Gesichtsfelder ohne Präparate ergebe bei gleicher Beleuchtung einen Wert von 45° für den Winkel α . Der Polarisator absorbiert in diesem Falle 75% des Lichtes. Das ergibt sich aus der Erwägung, daß beim Lichtdurchtritt durch ein Polarisationsprisma bereits 50% des eintretenden Lichtes absorbiert werden und dann vom durchtretenden Licht noch einmal 50% absorbiert werden, da doch der Winkel α eben 45° beträgt. Ist dann Gleichheit in der Helligkeit der beiden Teile des Gesichtsfeldes erreicht, so kommen die Präparate unter die Mikroskope. Wenn das beim Polarisator befindliche Präparat stärker absorbiert, so dreht man den Polarisator von 45° in der Richtung zu 0° hin; im umgekehrten Falle gegen 90° zu. Im ersten Falle subtrahiert man von $\cos^2 45^\circ$ das Quadrat des Kosinus des gefundenen Winkels; im zweiten Falle dagegen subtrahiert man den $\cos^2 45^\circ$ vom Quadrat des Kosinus des gefundenen Winkels. Das Resultat stellt die prozentuellen Differenzen der Absorption zwischen dem stärker und dem schwächer absorbierenden Präparat dar.

Um erfolgreich kolorimetrisch arbeiten zu können, ist es notwendig, daß die zu vergleichenden Präparate in ihrem Absorptionsvermögen nicht allzu verschieden sind, und es ist daher auch verständlich, daß man nie die ganz verfügbare Meßstrecke von 45° bis 0° oder bis 90° braucht. Hat man es aber mit besonders stark absorbierenden oder besonders transparenten Objekten zu tun, so ist es zweckmäßig, von einer gleichen Stufenbeleuchtung auszugehen, die entweder recht niedrig oder recht hoch gehalten ist, um auf diese Weise eine bessere Ausnützung des Lichtes zu erreichen. Da die Werte aus der Differenz der Quadrate des Kosinus des zu Beginn abgelesenen Winkels und des zu Ende abgelesenen errechnet werden, tut dies der Genauigkeit der Messungen keinen Abbruch. Man nähert sich damit jenen Bedingungen, unter denen man bei Vorhandensein zweier Polarisationsmikroskope arbeitet. Bei Ablesungen, wo man bereits vorher weiß, daß ein Präparat in allen zu messenden Punkten ein geringeres Absorptionsvermögen als das Kontrollpräparat aufweist, kann man auch von einem Winkel $\alpha = 0^\circ$ ausgehen; so wird man die Beleuchtungsmöglichkeiten der Einrichtung bis ins Letzte ausnützen können.

Um ein Bild von der Größe des Prozentwertes einer Kosinusdifferenz von je 1° zu geben, seien als Beispiele angeführt:

von 30° — 31° : 1,5%; von 45° — 46° : 1,7%; von 59° — 60° : 1,5%.

Diese Zahlen zeigen, daß innerhalb der Grenzen der schätzbaren Ausnützbarkeit der Beleuchtung die Gradablesung ausreichende Näherungswerte liefert, insbesondere im Falle zweier Präparatteile, welche in der Regel einen einzigen Teil der beiden mikroskopischen Halbfelder einnehmen. Mit Teilungen von $\frac{1}{1}^\circ$ kann man aber auch noch $\frac{1}{2}^\circ$ durch Schätzung ablesen.

Die Vorrichtung wird von uns hauptsächlich bei histologischen Untersuchungen verwendet, in denen die zu kolorimetrierenden Substanzen in der

Regel einfachbrechend sind. Sollten die Substanzen doppelbrechend sein, wie dies häufig bei mineralogischen Untersuchungen der Fall ist, dann würden natürlich gewisse Schwierigkeiten auftreten. Diese können aber leicht dadurch überwunden werden, daß man die optischen Eigenschaften des zu untersuchenden Materials berücksichtigt: weist das Material keine Erscheinungen von Pleochroismus auf, so kann man die Messungen mit einem gewöhnlichen Mikroskop ausführen; im anderen Falle wird man eben ein Polarisationsmikroskop unter Ausschaltung des Prismenanalysators verwenden müssen und die Ablesung in den Positionen maximaler und minimaler Absorption des Präparates vornehmen.

Die ohne Filter angestellten Messungen erlauben kolorimetrische Feststellungen; gibt man aber in das Okular zwischen den beiden Linsensystemen ein geeignetes Filter, so kann die Untersuchung auch eine photometrische werden. Wir konnten feststellen, daß — wenigstens in einigen Fällen — die Beleuchtungsstärke, die wir erhalten, derart ist, daß diese den Gebrauch selbst sehr selektiver Filter, wie sie jene des Photometers nach PULFRICH sind, gestatten; wiederholt man dann die Ablesung durch die Serie der Filter mit verschiedenen Wellenlängen, kann man sogar eine Art Spektrophotometrie erzielen. Ein weiteres Hilfsmittel, um die Messungen zu beschleunigen, wäre es daher, ein Okular mit auswechselbaren Filtern zu benützen.

Die Apparatur kann außer zum Vergleich zweier Präparatstellen auch noch anders benützt werden, und zwar sowohl mit zwei Polarisationsmikroskopen als mit nur einem. Gibt man zum Beispiel unter eines der beiden Mikroskope kein Präparat, so erreicht man — bei Benützung eines Polarisators — dieselben Resultate, die man sonst mit dem Photometermikroskop von LEITZ oder mit dem Photometerokular von HASCHEK-HAITINGER erzielen kann. Untersuchungen jener Art, wie sie von DEMPSEY, WISLOCKI und SINGER mit Hilfe des DUBOSCQ-Kolorimeters durchgeführt wurden, kann man anstellen, wenn man eine Küvette bekannter Dicke, die mit einer Farblösung bekannter Konzentration beschickt ist, unter eines der beiden Mikroskope stellt. Auch ist die Vorrichtung als gewöhnliches Photometer zu gebrauchen, um photometrische Untersuchungen auf mikrochemischem Gebiete zu machen. In diesem Falle stellt man die Mikroküvetten unter beide Mikroskope. Als Mikroküvetten kann man Zählkammern verwenden oder auch Küvetten von entsprechender Tiefe, zum Beispiel nach den Angaben von CASPERSSON und von NORBORG.

Literatur

- Caspersson T* Journ. Roy. Microsc. Soc. **60** (1940), 8.
— in *Nucleic Acid*. Cambridge University Press (1947): 127.
Dempsey E. W., Wislocki G. B. und Singer M., Anat. Rec. **96** (1946): 221.
Hydén H., Acta Physiol. Scand. **6** (1943), suppl. 17.
Kelley E. G., Journ. Biol. Chem. **127** (1939): 73.
Marza V. D. und Chiosa L., Bull. Hist. Appl. **12** (1935): 58.
Norborg B., Acta Physiol. Scand. **5** (1942), suppl. 14.
Vialli M. und Reggiani M., Boll. Soc. Med. Chir. Pavia **62** (1948).

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1949

Band/Volume: [4](#)

Autor(en)/Author(s): Vialli Maffo, Reggiani Marco

Artikel/Article: [Methoden für die Kolorimetrie und Photometrie mikroskopischer Präparate. 158-161](#)