

Alte und neue optische Hilfsmittel der mikroskopischen Spezialforschung

Von Prof. Dr. E. Hintzsche

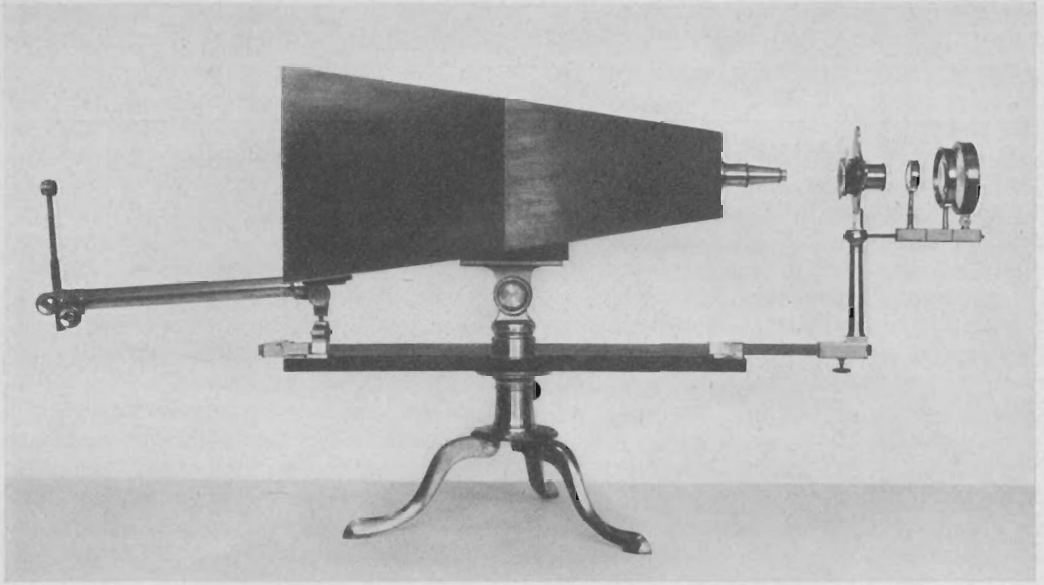
Seit es eine wissenschaftliche Mikroskopie gibt, besteht das Bedürfnis nach einer möglichst genauen bildlichen Wiedergabe der Beobachtungen. Eine sehr geeignete Methode ist schon verhältnismäßig früh in der Projektion erkannt worden. Dazu waren besonders die mit einfachen Linsen versehenen Sonnenmikroskope geeignet, die aus der *Laterna magica* entwickelt worden waren. Dargestellt hat u. a. das Prinzip des Sonnenmikroskopes Athanasius Kircher im Jahre 1671. Der Erlanger Mediziner und Professor der Mathematik Theodor Balthasar wies in seiner *«Micrometria»* (Erlangen 1710) auf die Möglichkeit hin, im Projektionsbild Messungen vorzunehmen; nur einen Schritt weiter bedeutete die Nachzeichnung des Bildes auf dem als Projektionsschirm benutzten Papier. Georg Friedrich Brander (s. S. 4249) und andere Optiker jener Zeit gebrauchten schon einen schräg stehenden Spiegel, um das Präparat auf einer horizontal liegenden Glasplatte abzubilden (Brander 1767). Selbstverständlich entsprach die Güte der Wiedergabe dem jeweils erreichten Stande des Objektivbaues. Solange genügend starke künstliche Lichtquellen fehlten, blieb man bei der Beleuchtung der Präparate auf das direkte Sonnenlicht angewiesen. Erwähnt sei noch, daß mit

solchen Sonnenmikroskopen auch die ersten mikrographischen Aufnahmen von Joseph Berres (1796–1844) in Wien und von Alfred Donné (1801–1878) und Jean-Bernard-Léon Foucault (1819–1868) in Paris angefertigt wurden. Die Entwicklung im einzelnen zu verfolgen, die Mikroprojektion und Mikrophotographie seither durchlaufen haben, ist hier nicht möglich, dagegen soll noch von den speziellen Zeichenapparaten berichtet werden. William Hyde Wollaston (s. S. 4255) führte 1811 in seiner *Camera lucida* das Prisma ein; mit ihm waren gleichzeitig das Präparat und der Zeichenstift scharf zu sehen. Auch heute sind noch derartige Prismen im Handel; sie werden zum Teil mit Spiegeln kombiniert, um die Zeichnungen auf horizontaler Fläche anfertigen zu können; dabei ist durch Einschaltung von Rauchgläsern für gleichmäßige Helligkeit der Zeichenfläche und des Präparates zu sorgen.

Ein ebenso altes Problem wie das der Wiedergabe der Befunde ist für den Mikroskopiker das der ausreichenden Beleuchtung der Präparate. Da die Untersuchung in durchfallendem Licht die am weitesten verbreitete Arbeitsweise ist, sind die hierzu notwendigen Beleuchtungseinrichtungen schon zusammen mit der Ausgestaltung des Mikroskopes zum mo-

Instrument vom Typus Wilson zur Verwendung als «Sonnenmikroskop» eingerichtet. Der Spiegel im Vordergrund wurde beim Gebrauch auf der Rückseite des Instrumentes eingehängt. Ende 18. Jahrhundert. Medizinhistorisches Museum, Kopenhagen.





Projektions-Mikroskop von Jeppe Hansen Smith (1759-1821), dänisches Fabrikat. Anfang 19. Jahrhundert. Medizinhistorisches Museum, Kopenhagen.

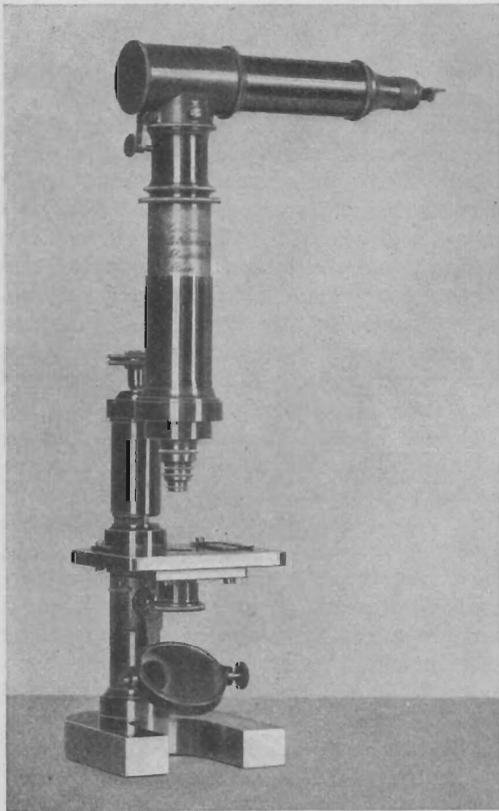
deren Forschungsinstrument besprochen worden (s. S. 4254f.). Als wichtige ergänzende Methode ist hier noch die Untersuchung im Dunkelfeld zu erwähnen. Es handelt sich dabei um ein schon altes Verfahren, das sich aus der schiefen Beleuchtung entwickelt hat. Ein genügender Kontrast zwischen dem Präparat und seiner Umgebung entsteht allerdings erst bei allseitig schiefer Beleuchtung; diese erlaubt gleichzeitig auch die Verwendung stärkerer Objektive. Th. Ross empfahl dafür schon vor 1855 seine «Spotlens» als Kondensor, eine plan-konvexe Linse mit abgeschliffenem und geschwärtztem Scheitel, der dem Präparat zugekehrt wurde. Er hatte mit seinem Kondensor das Prinzip der Ablendung aller zentralen Strahlen erfunden, denn das Licht tritt bei der erwähnten Anordnung nur durch den äußeren Rand der Linse hindurch. Weitere Verbesserungen dieser Einrichtung stammen von Wenham (s. S. 4252); indem er die Frontlinse des Kondensors durch Terpentinöl mit dem Objektträger verband und so eine Lichtreflexion von dessen Unterseite vermied, schuf er den Immersionskondensor. Auf Wenham geht auch der Gebrauch von Paraboloiden aus Metall zurück, die die Lichtstrahlen mit größerem Neigungswinkel in das Präparat werfen. Interessanterweise wurde die Dunkelfeldbeleuchtung ursprünglich falsch gedeutet, nämlich als Reflexion von

der Unterseite des Deckglases her, d. h. als eine Art Auflichtbeleuchtung, während in Wirklichkeit doch die vom Präparat selbst abgelenkten Strahlen in das Objektiv eintreten. Schon aus dieser Tatsache ergibt sich, daß die größere Feinheit der Beobachtung bei der Untersuchung im Dunkelfeld nicht auf einer besseren Auflösung beruht. Die kleinsten Teilchen erscheinen deutlicher, sofern sie nur genügend weit auseinander liegen, weil sie sich kontrastreich gegen den dunklen Grund abheben. In Wirklichkeit sind es aber Beugungsbilder, nicht die Formen der Teilchen selbst, die man wahrnimmt. Nur unter Berücksichtigung bestimmter Eigenschaften des abgelenkten Lichtes, z. B. seiner Farbe und seines Polarisationszustandes, oder mit Hilfe des Azimuteffektes lassen sich Schlüsse auf Größe und Form der abgebildeten Teilchen ziehen. Da die optischen Firmen jetzt äußerst bequem zu handhabende Dunkelfeldkondensoren herstellen, wäre diesem nützlichen Hilfsmittel für die mikroskopische Spezialforschung eine größere Verbreitung zu wünschen; besonders empfehlenswert sind die Wechselkondensoren, die den Übergang von der Hell- zur Dunkelfeldbeleuchtung leicht gestatten. Für den Nachweis von Spirochäten, die Demonstration lebender Spermien, die Untersuchung der morphologischen Vorgänge bei der Blutgerinnung und das Studium veraschter Präpa-

rate ist keine andere Methode besser geeignet als die Dunkelfelduntersuchung.

Weitere interessante Entwicklungsstadien hat auch die Auflichtmikroskopie durchlaufen. Die Beleuchtung undurchsichtiger Objekte erfolgte von alters her entweder durch seitlich angebrachte Kollektorklinsen (Hooke, s. Titelbild) oder durch einen das Objektiv umschließenden Hohlspiegel (Leeuwenhoek-Lieberkühn, s. Abb. S. 4248 u. S. 4250), der das neben dem Präparat vorbeitretende Licht auf dieses zurückwirft. Beide Methoden sind noch heute im Gebrauch, die seitliche Beleuchtung z. B. bei der 1916 von Otfried Müller (geb. 1873) als klinische Untersuchungsmethode eingeführten Kapillarmikroskopie. Hinsichtlich der Wirkungsweise sind sie deutlich voneinander verschieden; gemeinsam ist beiden dagegen die Beschränkung auf den Gebrauch mit Objektiven langer Brennweite. Zur Überwindung dieser Einschränkung sind Opakilluminatoren konstruiert worden. Das Prinzip geht zurück auf Hewitt, nach dessen

Kleines Mikroskop von Hartnack, Paris, mit aufgesetztem Oberhäuserschem Zeichenapparat. Anat. Institut, Bern.

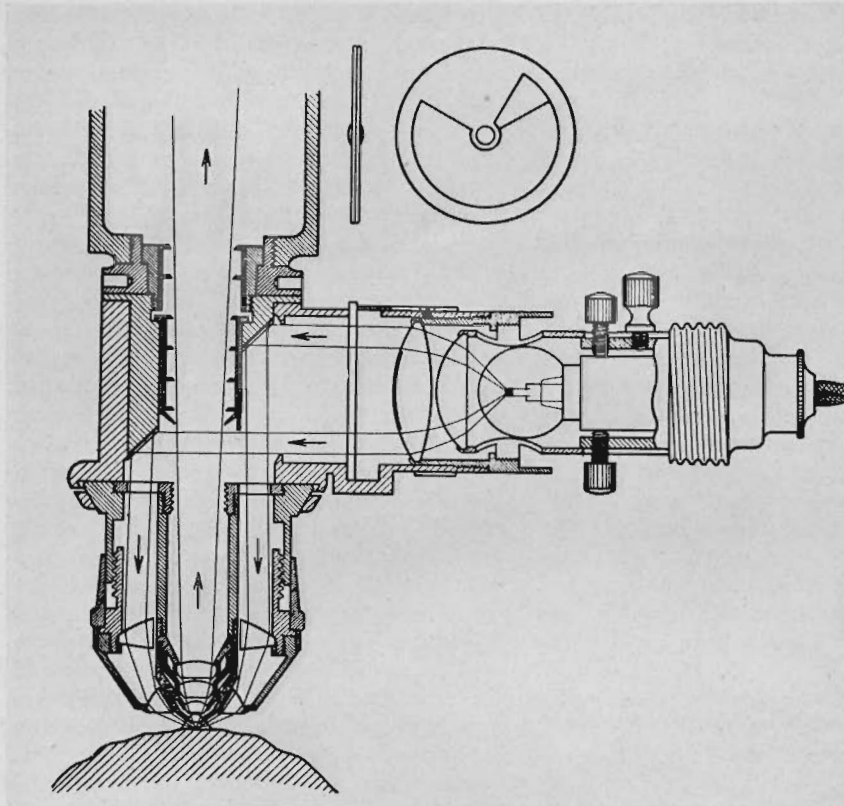


Vorschlag Wenham 1865 oberhalb des Objektives einen Ringspiegel in den Tubus einbaute, der durch eine in diesem angebrachte seitliche Öffnung beleuchtet wurde. Bei entsprechender Schrägstellung des Spiegels konnte so das Präparat von oben her durch die Linsen des Objektives hindurch beleuchtet und doch durch die zentrale Öffnung des Spiegels betrachtet werden; Richard Beck benutzte statt des Spiegels eine planparallele Glasplatte, Nacet ein reflektierendes Prisma. 1924 haben Chapman und Allridge eine Anordnung erdacht, bei der die Beleuchtungsstrahlen durch ein besonderes Linsensystem neben dem eigentlichen Objektiv vorbei von allen Seiten her schräg auf das Präparat geworfen werden. Im Prinzip handelt es sich dabei um eine Art Dunkelfeldbeleuchtung von oben her. Unabhängig davon hat auch H. Heine 1928 eine ähnliche Konstruktion geschaffen, den Ultrapak Leitz. Dieses Instrument erfordert aber die Verwendung von Objektiven in Spezialfassung, da Deckgläser der Reflexe wegen vermieden werden müssen, wenn man nicht etwa eine Abhilfe in der Verwendung polarisierten Lichtes sucht. Mit diesem und ähnlichen Instrumenten hat die biologische Forschung neue Möglichkeiten zu Organ- und Gewebsuntersuchungen in vivo erhalten.

Grundsätzlich anders ist demgegenüber die Methode der Lebendbeobachtung, bei der nach dem Vorgehen von Paul Vonwiller (geb. 1885) Öltropfen, Nadeln oder Metallblättchen unter die Haut bzw. die Organoberfläche eingeführt werden (1925). Da diese das vom Opakilluminator her einfallende Licht reflektieren, entsteht ein der Untersuchung in durchfallendem Licht ähnlicher Strahlengang.

Wieder anders zu bewerten ist die Untersuchung lebender Gewebe unter Zuhilfenahme fluoreszierender Substanzen. Bringt man solche Stoffe in hoher Verdünnung z. B. durch die Blutbahn ins Gewebe, wie das Philipp Ellinger (geb. 1887) und August Hirt (geb. 1898) vorgeschlagen haben (1929), so kann es zu selektiver Imprägnierung bestimmter Bestandteile kommen, die bei Ultraviolettbestrahlung durch unterschiedliche Stärke und Farbe der Fluoreszenz Einzelheiten erkennbar macht. Intravitale Untersuchungen an den Harnkanälchen oder über die Gallenbildung innerhalb der Leberzellen sind z. B. auf diese Weise möglich geworden.

Fluoreszenz findet sich aber auch gelegentlich als primäre Eigenschaft bestimmter Ge-



Strahlengang in einem modernen, speziell für Auflichtbeleuchtung eingerichteten Mikroskop (Ultropak Leitz). Aus H. Heine «Das Ultropak. Mitteilungen aus den Leitzwerken in Wetzlar». Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik. Band 48, 1931.

websbestandteile, sie ist allerdings meist nur schwach. In solchen Fällen kann die Untersuchung durch Ultraviolettstrahlen ohne besondere Vorbehandlung erfolgen. Die sichtbaren und auch photographisch erfaßbaren Effekte beruhen dabei auf der Erscheinung, daß ein derartig belichtetes Objekt selbst wieder zu einem strahlenden Körper wird. Die Bestrahlung kann sowohl nach der Art des durchfallenden wie nach der des auffallenden Lichtes vorgenommen werden, zur Vermeidung der Strahlenabsorption müssen aber bei durchfallendem Ultraviolett Kondensoren mit Quarzlinsen und eventuell auch Quarzobjektträger benutzt werden. Durch ein für Ultraviolett undurchlässiges Sperrfilter, das auf das Okular aufgelegt wird, ist ferner das Auge des Untersuchers vor der Strahlenwirkung zu schützen.

Neben der Fluoreszenzuntersuchung besteht aber noch eine wirkliche Ultraviolett-Mikroskopie, die Probleme anderer Art zu lösen erlaubt; sie erfordert eine vollständige Quarzoptik in allen Teilen des Mikroskopes. Die dabei entstehenden Bilder können auf einem Leuchtschirm betrachtet oder

noch besser mit ultraviolett-empfindlichem Material photographisch festgehalten werden. Eine sehr geschickte Anwendung dieser Methode fand Th. Caspersson; er hat mit ihr den Nukleinsäuregehalt der Chromosomen und der Nissl-Schollen an der elektiven Absorption bei 2600 \AA nachgewiesen. Die Anwendung ultraviolett Lichtes für mikrophotographische Zwecke empfiehlt sich im besonderen wegen der damit erzielten Steigerung der Auflösung, die gegenüber der im Tageslicht eintretenden Auflösung bis auf das Doppelte erhöht sein kann; damit beträgt die von Abbe als «förderliche Vergrößerung» bezeichnete optimale Leistung das 1000–2000-fache der numerischen Apertur. Für solche Untersuchungen geeignete Quarzobjektive hat Moritz von Rohr (s. S. 4251) im Jahre 1904 berechnet, sie sind als Monochromate der Firma Zeiß im Handel und ergeben sehr kontrastreiche Abbildungen.

Auch für die gewöhnliche Mikroskopie in durchfallendem Licht ist eine Steigerung der Auflösung zu erzielen, wenn ein genügend isoliertes kurzwelliges Licht zur Beobachtung benutzt wird. Unterdrückt man z. B. durch

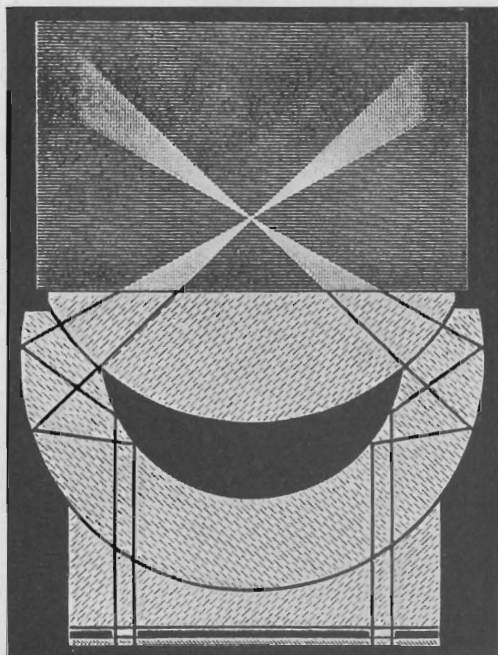
ein geeignetes Filter alle Strahlen, die längere Wellen haben als $0,44 \mu$, d. h. Blau in der Nähe der Fraunhoferschen Linie G', so sind z. B. schon die Grenzwerte der förderlichen Vergrößerung auf das 625- bis 1250-fache der numerischen Apertur verschoben.

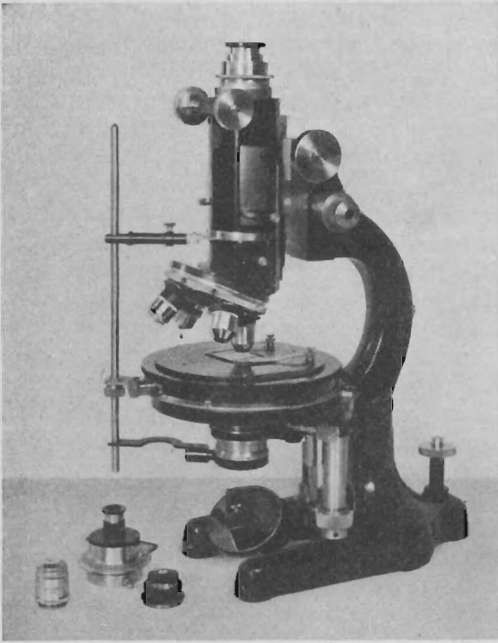
Die eben beschriebenen Fortschritte der mikroskopischen Untersuchungstechnik sind möglich geworden dank der Weiterentwicklung von Abbes Theorie der sekundären Bildentstehung im Mikroskop, die die Bedeutung der Wellennatur des Lichtes ausreichend berücksichtigt. Auf der gleichen Basis wird auch das neueste optische Untersuchungsverfahren, die Phasenkontrast-Mikroskopie, verständlich. Native ungefärbte Objekte sind in der Regel wenig kontrastreich. Die zur Untersuchung solcher Präparate gelegentlich gebrauchte starke Ablendung verringert das Auflösungsvermögen der Objektive erheblich, ist also in der Anwendung begrenzt. Eine Dunkelfelduntersuchung kann gelegentlich nützlich sein, doch gibt sie nur Beugungsbilder von den Grenzflächen zwischen verschiedenen brechenden Medien, ist also nicht für jedes Objekt geeignet. Hier füllt das Phasenkontrast-Verfahren eine bisher vorhandene Lücke aus. Bekanntlich entstehen beim Durchtritt des Lichtes durch ein Gitter, das wechselweise aus lichtdurchlässigen und lichtabsorbierenden Streifen besteht, Beugungsbilder; diese nehmen an Helligkeit mit der Entfernung von der optischen Achse des Mikroskopes ab. Die Beugungsbilder rufen durch Interferenz, d. h. durch gegenseitige Beeinflussung der Strahlenbündel, die von brechenden Stellen ausgehen, erst das eigentliche Bild des Präparates in der Bildebene des Objektives hervor. Demgegenüber hat der holländische Physiker Frits Zernike 1934 nachgewiesen, daß beim Durchgang durch ein vollkommen durchlässiges Gitter, das wechselweise aus dicken und dünnen Streifen besteht, der Schwingungszustand der abgebeugten Lichtbündel verändert wird. Die vom Objektiv entworfenen Beugungsbilder unterscheiden sich in diesem Falle nämlich nicht durch ihre Amplitude, sondern durch Verschiebung ihrer Phase um ein Viertel der Wellenlänge, wobei unter dem Begriff «Phase» derjenige Weg des Lichtteilchens zu verstehen ist, den es bei seiner Schwingung zwischen dem Kulminationspunkt eines Wellenberges und dem tiefsten Punkt des folgenden Wellentales zurücklegt. Da weder das menschliche

Auge noch die photographische Platte gegen so geringe Phasenverschiebungen empfindlich ist, können sie nicht direkt wahrgenommen werden. Wenn es dagegen gelänge, die Phasenunterschiede auszugleichen, d. h. Wellenberg auf Wellenberg und Wellental auf Wellental fallen zu lassen, so würden die Phasendifferenzen gleichsam in Amplitudenunterschiede umgewandelt, wodurch verstärkte Helligkeitsunterschiede hervorgerufen würden, die das Auge aufzunehmen vermöchte. Dünne, ungefärbte Nativpräparate ergeben also nur deshalb so schwach kontrastierende Bilder, weil sie wie ein Phasengitter wirken. Betrachtet man sie aber durch ein Objektiv, das in seiner bildseitigen Brennebene ein lichtdurchlässiges Gitter besitzt, so werden die Phasenverschiebungen ausgeglichen und die Strukturen des Präparates kontrastreich wiedergegeben. Daß in vielen Fällen die Untersuchung lebensfrischer Zellen äußerst aufschlußreich ist, wird jedem verständlich sein, der weiß, zu welchen Trugbildern die gewöhnlichen histologischen Fixations- und Einbettungsmethoden führen können.

Auch die Polarisationsmikroskopie macht sich Besonderheiten der Lichtschwingung zunutze. Erasmus Bartholinus (1625–1698) beschrieb 1669 eine ihm auffallende Eigenschaft

Strahlengang im Kardioid-Dunkelfeldkondensator. Aus der Zeiß-Druckschrift «Mikro 368», 1922.





Mineralogisches Forschungsmikroskop Winkel-Zeiß, ausgerüstet für physikalische Messungen. Ist die Amici-Bertrand-Linse eingeschaltet, so besteht das Instrument im Prinzip aus zwei ineinandergeschobenen Mikroskopen. Die Polarisation erfolgt durch ein Ahrens-Prisma. Neben dem Mikroskop liegend sind abgebildet der aufsetzbare Analysator mit Teilkreis und Kompensationsplättchen auf Schieber sowie ein Immersionsobjektiv samt zugehörigem Kondensator von 1,52 numerischer Apertur. Photo: Ganz & Co., Zürich.

des Kalkspates: Legt man einen Calcitkristall auf ein Stück bedruckten Papiere, so sieht man die Schrift doppelt, und zwar deshalb, weil jeder Lichtstrahl, der den Kalkspat quer zu dessen optischer Achse durchdringt, in zwei Teile zerlegt wird. Diese Erscheinung ließ sich erst nach Vorarbeiten von Christiaan Huyghens (s. S. 4250) und Wollaston (s. S. 4255) und, nachdem die Polarisation des Lichtes erkannt war, richtig deuten. Etienne-Louis Malus (1775–1812) beschrieb 1808 ihr Auftreten bei Reflexion und regelmäßiger Brechung in isotropen Körpern. In einem Mikroskop mit Lupenoptik nützte sie als erster Brewster aus. Von 1830 an stützte sich auch Amici (s. S. 4251) beim Bau seines Spezialmikroskopes auf das von Malus entdeckte Prinzip der Polarisation durch Schichten von Glastafeln. William Nicol (etwa 1768–1851) in Edinburgh wußte den einen der beiden Strahlen zu eliminieren, indem er Prismen von Kalkspat auf besonders geschickte Weise zusammen-

fügte, so daß aus dem Prismensystem Licht austritt, das ausschließlich in einer Ebene schwingt (1828, 1839). Die für das zusammengesetzte Mikroskop geeignete Anordnung zur Untersuchung in polarisiertem Licht mit Polarisator und Analysator aus Nicol-Prismen gab zuerst William Henry Fox Talbot (1800 bis 1877) in den dreißiger Jahren an. Einen zusammenfassenden Bericht über ältere polarisationsmikroskopische Befunde hat im Jahre 1861 Gabriel Gustav Valentin (1810–1883) veröffentlicht, später haben vor allem Theodor Wilhelm Engelmann (1843–1909), Victor von Ebner (1842–1925) und Walter Gebhardt (1870–1918) die Methode häufig angewandt; sie ermöglicht dem Geübten einen vorzüglichen Einblick in die Feinstrukturen. Sie breitet sich deshalb auch immer mehr aus, wozu nicht zum wenigsten die von Ferdinand Bernauer (1892–1945) erfundenen großflächigen Filter aus Herapatit beitragen, die billiger sind als die aus Kalkspat; sie erweisen sich im praktischen Gebrauch als für viele Zwecke ausreichend, obschon sie nicht ganz farbfreie Abbildungen geben. Weiter entwickelte und feiner ausgestaltete Instrumente sind vor allem für die genaue Unterscheidung der Form- und der Eigendoppelbrechung notwendig. Auf Anregung des Gießener Zoologen Siegfried Becher sind z. B. anastigmatische Tubusnicols eingeführt worden; moderne Instrumente sind mit dem Prisma nach Glan-Thompson oder dem dreiteiligen Prisma nach Ahrens ausgerüstet. Ebenso sind die Einrichtungen zum Nachweis und zur Messung schwacher Doppelbrechung wesentlich verbessert worden. Zu nennen sind als fortschrittliche Konstruktionen auf diesem Gebiet vor allem der von der Firma Leitz seit 1913 hergestellte Kompensator nach Max Berek und die gleichen Zwecken dienenden, aber weit empfindlicheren Instrumente, die 1921 von August Köhler (geb. 1866) und 1932 von Guido Szivessy (geb. 1885) berechnet worden sind.

Mit diesen Mitteln gibt die mikroskopische Forschung mehr und mehr Aufschluß über Beschaffenheit, Form und Lage auch der submikroskopischen Bausteine doppelbrechender Objekte; sie hat damit die Grenzen schon weit überschritten, die früher für die Leistungsfähigkeit des Lichtmikroskopes angenommen wurden, und sie dürfte auch heute noch keineswegs am Ende ihrer Entwicklung angekommen sein.