



# **Microspectrophotometrie van fluorescentielicht : een methode van histologisch onderzoek**

<https://hdl.handle.net/1874/360690>

51. opt. 192, 1942

**MICROSPECTROPHOTOMETRIE  
VAN FLUORESCENTIELICHT,  
een methode van histologisch onderzoek**

ht

2









MICROSPECTROPHOTOMETRIE VAN  
FLUORESCENTIELICHT.

een methode van histologisch onderzoek.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJFING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE WETENSCHAP VAN  
DE ZIEKENHUISLEER EN DE HIEPCHIT, OF

**MICROSPECTROPHOTOMETRIE VAN  
FLUORESCENTIELICHT,**

een methode van histologisch onderzoek.

BEZELT VAN DEN VERENIGDEN UNIVER-  
SITAIR TOEGANG DE WETENSCHAP VAN  
DE FACULTEIT DER WETENSCHAPEN EN  
VERBODEN OP DINSDAG 25 APRIL 1941  
DER NACHMIDDAG TE 4 UUR

DOOR

WILHELMUS VAN DER WOUDE,

DIENSTVERBODEN DE WETENSCHAPEN

DE WETENSCHAPEN - DE WETENSCHAPEN

MICROSCOPY  
ELECTRONIC  
COPYING

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT  
  
3812 2895

*Diss. Utrecht 1942*

**MICROSPECTROPHOTOMETRIE VAN  
FLUORESCENTIELICHT,  
een methode van histologisch onderzoek.**

**PROEFSCHRIFT**

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN  
DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP  
GEZAG VAN DEN WAARNEMEND RECTOR  
MAGNIFICUS L. VAN VUUREN, HOOG-  
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER LET-  
TEREN EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS  
BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVER-  
SITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN  
DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE  
VERDEDIGEN OP DINSDAG 28 APRIL 1942,  
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

**MARCEL TIJS JANSEN,**  
GEBOREN TE WITMARSUM (FRIESLAND).









## VOORWOORD.

Hoewel mijn studie bij het verschijnen van dit proefschrift nog niet beëindigd is, betuig ik hier in de eerste plaats mijn dank aan U, Hoogleraren en Docenten van de Utrechtse Universiteit, voor Uw aandeel in mijn vorming tot arts.

Hooggeleerde Boeke, meerdere jaren heb ik, eerst als gast, later als assistent, in Uw laboratorium mogen doorbrengen. Ik heb U in dien tijd niet alleen als man van de wetenschap, doch ook als mens hoog leren schatten. Gij hebt mij, door Uwe grote vriendelijkheid en tegemoetkomendheid in alle opzichten, telkens weer bewezen hoe belangrijk het is, dat er aan het hoofd van een laboratorium iemand staat, die zijn mensen warm tegemoettreden kan. Dat Gij mijn promotor hebt willen zijn, is mij een groot voorrecht.

Zeergeleerde Berkelbach v. d. Sprenkel, veel heb ik geleerd van de wijze waarop Gij, bij Uw eigen onderzoek en bij Uw voortdurende belangstelling en aanmoediging voor het mijne, vasthieldt aan strenge fysieke eisen en criteria; ik ben oprecht blij, dat hetgeen in dit proefschrift is neergelegd, in Uw oog aan dezelfde eisen voldoet. Het is hier niet de plaats, om uit te weiden over het vele waardevolle, dat ik uit onze lange gesprekken in het leven medeneem of over de welwillendheid en het onuitputtelijke geduld, waarmede Gij mij altijd weer hebt aangemoedigd en geholpen. Ik dank U slechts voor de vele blijken van vriendschap, in den ruimsten zin van het woord, die Gij mij hebt betoond.

Hooggeleerde Ringer en Zeergeleerde Terwen, U beiden zeg ik dank voor de bereidwilligheid, waarmede Gij mij voorzaagt van enkele zeer zuivere urobiline-monsters. Ook U beiden, Hooggeleerde Julius en Zeergeleerde Tausk, doe ik mijn dank toekomen voor de monsters zuivere vitaminen en hormonen, die Gij mij afstondt. Hooggeleerde Nieuwenhuysse, Gij liet mij de beschikking over sectie-materiaal; ik betuig U hiervoor mijn hartelijke dank.

U allen, die het personeel van het Embryologisch en Histologisch Laboratorium vormt, breng ik op deze plaats mijn welgemeende dank voor Uw onvermoeide hulpvaardigheid en Uw grote vriendelijkheid, die er toe bijdroegen, dat de jaren op dit laboratorium voor mij altijd zulk een prettige herinnering zullen vormen.

Zeergeachte Mej. du Buy, een groot deel van het ondankbare administratieve werk, dat aan de voorbereidingen van een proefschrift inhaerent is, hebt Gij mij uit handen genomen. Mijn hartelijke dank voor de toewijding, waarmede Gij mij ook in dit opzicht geholpen hebt.





## ALGEMEEN OVERZICHT.

Indien men leest over de fluorescentieverschijnselen, die in microscopische preparaten waargenomen kunnen worden, dan valt op, hoe onvolledig de aanduiding van de kleuren van het fluorescentielicht vaak is. Benamingen als „zachtrose” en „lichtblauw met violette inslag” zijn als voorlopige opgave bruikbaar, maar volkomen ongeschikt als het er om gaat anderen iets mede te delen over conclusies aangaande de aard der stoffen, die aan een bepaald deel van het preparaat een speciale fluorescentie verlenen. Dit geldt bij uitstek voor die gevallen, waar de fluorescentiekleuren weinig uiteenlopend zijn. Zo zal bijvoorbeeld het nierepithel na een subcutane injectie van een sterk fluorescerende stof als fluoresceïne spoedig oplichten in de voor deze stof karakteristieke groene kleur, zodat er weinig twijfel bestaat kan over de aanwezigheid van die stof in de nierepithelcellen. Heel anders wordt het evenwel, als de concentratie van de gezochte stof zeer gering wordt. Dan zal het nodig zijn om de intensiteit van het, de fluorescentie opwekkende, licht sterk te verhogen. Dit kan evenwel niet geschieden, zonder dat tevens de zwakke, blauw gekleurde, fluorescentie van de cel-eiwitstoffen hinderlijk wordt. Er ontstaan dan mengkleuren van de groen fluorescerende fluoresceïne en de blauw fluorescerende eiwitstoffen. In die mengkleuren zullen door het oog de componenten niet gescheiden waargenomen kunnen worden en het gevoel van zekerheid, dat de epithelcellen in de nier fluoresceïne bevatten, maakt plaats voor een gevoel van twijfel, of de kleur nog wel „groenig” genoeg is om de aanwezigheid van fluoresceïne te bewijzen.

De enige manier om langs de weg van de kleur van het fluorescentielicht ook in zulke gevallen zekerheid te krijgen omtrent de aanwezigheid van de gezochte stof, is die, waarbij van het fluorescentielicht het spectrum onderzocht wordt.

Onder de wijzen, waarop men in het algemeen een spectrum onderzoekt, kan onderscheiden worden tussen de spectroscopie en de spectrophotometrie. Bij de spectroscopie volstaat men met het bezien van het spectrum en met het noteren van de daarbij opvallende details; de resultaten bestaan bij deze onderzoeksmethode uit een opgave van de ligging der banden in het spectrum, voor zover die op deze wijze zichtbaar zijn, en van de volgorde in de intensiteiten van deze banden, indien zonder meting verschillen in deze intensiteiten zijn waar te nemen. Bij een spectrophotometrisch onderzoek daarentegen worden de intensiteiten van alle delen van het spectrum *gemeten*. De uitkomsten van een dergelijke meting worden gewoonlijk neergelegd in een curve, zodanig, dat de toppen in de curve corresponderen



met de heldere delen van het spectrum en de dalen met de daar tussen gelegen minder heldere gedeelten. Van zulk een curve zijn evenwel niet alleen de plaatsen van de banden af te lezen, doch bovendien de juiste verhoudingen in getallen van de intensiteiten in alle delen van het spectrum. Daarom geeft een spectrophotometrische curve een veel vollediger weergave van een spectrum dan een nog zo lange beschrijving van een spectroscopische waarneming. Bovendien vindt men op deze curven bijzonderheden in de intensiteitsverhoudingen binnen de banden en in ogenschijnlijk diffuse gedeelten van het spectrum, die ons bij spectroscopisch onderzoek ontgaan.

Hoe het in het algemeen mogelijk is om bij het fluorescentie-onderzoek van deze eigenschappen der spectrophotometrie partij te trekken, kunnen wij het beste aan een voorbeeld laten zien. Indien men een eiwitoplossing bereidt en het fluorescentielicht van deze oplossing spectrophotometrisch onderzoekt, dan zal men een curve krijgen met een geleidelijk van blauw naar rood afdalend verloop, geheel in overeenstemming met de mat-blaauwe kleur van het fluorescentielicht. Onderzoekt men evenwel de fluorescentie van een helder groen fluorescerende fluoresceïneoplossing op dezelfde wijze, dan toont de curve de vorm van een driehoek, gelegen tussen 500 en 600  $m\mu$ , met de top bij 530  $m\mu$ . De curve van een oplossing, die zowel eitwit als fluoresceïne bevat, laat van beide componenten de karakteristieke eigenschappen zien: een geleidelijk van blauw naar rood aflopende lijn, die tussen 500 en 600  $m\mu$  een verheffing vertoont met de top bij 530  $m\mu$ . Trekt men van elke waarde, die in deze curve is uitgezet, het aandeel, dat de „eiwitfluorescentie” in deze waarden heeft, af, dan houdt men juist de „fluoresceïnecurve” over; een curve, die in zijn gedaante volkomen gelijke intensiteitsverhoudingen aangeeft als die van een zuivere fluoresceïneoplossing.

*Door middel van de spectrophotometrie kan men dus in een mengsel stoffen herkennen door een voor die stoffen in hoge mate specifieke fysische eigenschap.*

Op volkomen gelijke wijze zijn in cellen stoffen, die een van de blauwe eiwitfluorescentie afwijkend spectrum vertonen, aan te tonen en zelfs te localiseren. Stoffen, die hiervoor in aanmerking komen, zijn dezulke, die spontaan een specifiek fluorescentielicht uitzenden of daartoe door een reactie gebracht kunnen worden. Een voorbeeld van de eerste categorie is het lactoflavine, een vertegenwoordiger van de tweede het urobiline. Voor het aantonen en localiseren van deze stoffen in een cel is het dus noodzakelijk, dat men het door onderdelen van de cel uitgezonden fluorescentielicht spectrophotometrisch kan onderzoeken. Het ligt voor de hand om hiertoe een bestaande opstelling voor fluorescentiemicroscopie uit te breiden met een der bekende microspectrophotometrische apparaten, doch indien men met een dergelijke combinatie tracht metingen uit te voeren aan de eigen fluorescentie van celonderdelen in

zeer dunne weefselcoupes blijkt het, dat het fluorescentielicht hiervoor veel te zwak is. De huidige opstellingen voor fluorescentie-microscopie zijn uitgerust met ultraviolette lichtbronnen, welke in weefselcoupes, die met fluorescerende stoffen „gekleurd“ (ge-„fluorochromeerd“) zijn, een voldoende sterke fluorescentie opwekken; voor het opwekken van een sterke fluorescentie in niet met deze stoffen behandelde praeparaten zijn zij evenwel te zwak. Doch indien men ook al de sterkste lichtbron, die de techniek ons levert, toepast, dan blijkt nog, dat het fluorescentielicht, dat in de praeparaten wordt opgewekt, zo zwak is, dat metingen met de huidige microspectrophotometrische methoden niet uitvoerbaar zijn. Alle bekende methoden voor dit doel zijn immers bedoeld voor sterk, doorvallend licht en zonder meer niet geschikt voor onze metingen aan het uitermate zwakke fluorescentielicht. Uit het ontbreken van een apparatuur, die zowel op het punt van de lichtbron, als op dat van de meetmethode aan de geringe lichtsterkte van de fluorescentieverschijnselen is aangepast, moet zonder twijfel het ontbreken van elke aanduiding in de literatuur over deze soort van metingen verklaard worden.

Bij de bewerking van dit proefschrift werd mij, in het kader van een wijder onderzoeksplan, als opgave gesteld te trachten in deze leemte in de histologische techniek te voorzien. Het hierna volgende geeft in de eerste plaats een kritische beschouwing van de fysieke eisen, waaraan een opstelling voor de microspectrophotometrie van fluorescentieverschijnselen moet voldoen en vervolgens een uitvoerige beschrijving van de door ons gebouwde apparatuur, waarbij aan deze theoretische eisen voldaan wordt. In een kort verslag van een histologisch onderzoek wordt de praktische bruikbaarheid van deze methode bewezen, terwijl uit dit onderzoek tevens blijkt, waar de grenzen van het prestatievermogen van deze methode bij de huidige fysieke hulpmiddelen liggen.

## I. INLEIDING.

Men spreekt van fluorescentie, wanneer een gas, een vloeistof of een vaste stof geabsorbeerde stralingsenergie weer als stralingsenergie uitzendt, zonder dat hierbij sprake is van buiging of reflexie en waarbij de emissie practisch tegelijk met de bestraling ophoudt.

Bestraalt men b.v. een oplossing van fluoresceïne in water met onzichtbaar ultraviolet licht, dan licht de vloeistof geelgroen fluorescerend op.

Men is nog niet voldoende ingelicht over het mechanisme van dit proces, doch zoveel is wel zeker, dat het geabsorbeerde licht een gedeelte van zijn energie overdraagt aan de moleculen van de fluorescerende stof, die daardoor overgaan in een toestand van excitatie. Deze toestand is labiel en duurt slechts kort; het molecuul valt snel terug op het oude energieniveau en zendt de



hierbij vrijkomende energie als straling uit. In het atoommodel kan men zich de verandering van de in het atoom opgehoopte energie voorstellen als een overgang van een electron van de ene baan in een andere, waarbij de potentiële energie van het electron ten opzichte van de kern verandert. Elke overgang, die met energieverandering gepaard gaat, uit zich in de opname of afgifte van een of meer energiequanten, welk proces wij waarnemen als absorptie of emissie van licht. Een grote energiesprong correspondeert naar de quantentheorie met licht van korte golflengte, een kleine met licht van grote golflengte.

Hiermede in overeenstemming zijn de waarnemingen bij de studie van de eenvoudigste vormen van fluorescentie: die der resonantiestraling. Dit verschijnsel doet zich voor bij eenvoudig gebouwde gassen van metaalatomen onder lage druk. Het geabsorbeerde licht heeft één golflengte (wordt dus in het absorptiespectrum weergegeven door één lijn) en het uitgezonden fluorescentielicht vertoont eveneens slechts één lijn bij dezelfde golflengte. Er is in het molecuul slechts één, voor dit molecuul volkomen typische energiesprong mogelijk: de door het molecuul opgenomen energie is gelijk aan de afgegeven energie bij de emissie en dus zijn golflengten van absorptie en emissie aan elkaar gelijk en ieder even specifiek voor de onderzochte stof. Dit geldt alleen in het geval van de resonantiestraling, in alle andere gevallen wordt door de meer gecompliceerde bouw van atomen en moleculen, door de inwerking van de moleculen op elkaar en door de thermische beweging van de moleculen de scherpte van de energieniveaux zó vervaagd, dat er in de plaats der scherp omschreven energiesprong van de resonantiestraling een hele serie energieovergangen van verschillende grootte mogelijk wordt. Hierdoor ontstaan in het absorptie- en emissiespectrum gecompliceerde lijnsystemen of zelfs, zoals bij de organische verbindingen regel is, min of meer vage banden. De genoemde factoren, die hun invloed doen gelden op de scherpte der energieniveaux, leiden ook bijna altijd tot een vermindering van de voor de emissie vrijblijvende energie. Daar, zoals boven werd vermeld, de kleinste energie correspondeert met de grootste golflengte, zal deze energievermindering zich in het spectrum uiten in een verschuiving van de emissiebanden ten opzichte van de absorptiebanden naar de rode zijde. Dit werd door Stokes in 1852 in de naar hem genoemde wet vastgelegd. Dat deze eigenschap van betekenis is voor de fluorescentieanalyse, is duidelijk. Hierdoor is het n.l. mogelijk om als fluorescentie opwekkende stralen licht te gebruiken, waarvoor ons oog niet gevoelig is: ultraviolet licht. In vele gevallen zal dan de fluorescentie juist in het zichtbare gebied vallen en zonder moeite bestudeerd kunnen worden.

Hoewel dus de verhoudingen niet overal zo eenvoudig zijn als bij de resonantiestraling, bestaat ook voor de organische verbindingen een principiële samenhang tussen de bouw van het mole-



cuul en de grootte der mogelijke energieovergangen. De afhankelijkheid van de golflengten van het geëmitteerde licht van de grootte der overgangen, maakt de spectrale analyse tot een noodzakelijke aanvulling van elk fluorescentieonderzoek, dus ook van het microscopische fluorescentieonderzoek in de histologie. Want, hoewel het door de grote complicaties in de bouw der moleculen en de wisselwerking der moleculen onderling, voorsnog niet mogelijk is om nauwkeurige opgaven te doen over het verband tussen constitutie en fluorescentiespectrum, blijkt het toch nu reeds, dat de fluorescentiebanden van sommige organische stoffen zeer bepaalde localisaties en intensiteitsverhoudingen kunnen vertonen, die heel goed bruikbaar zijn voor het typeren en herkennen van die stoffen.

Dat met de huidige methoden voor microspectrophotometrisch onderzoek geen metingen verricht zijn op het belangrijke gebied van de fluorescentiemicroscopie, is zeker te wijten aan het feit, dat deze methoden zonder uitzondering onbruikbaar zijn voor metingen aan het uitermate zwakke fluorescentielicht. Slechts indien men zijn toevlucht neemt tot de opwekking van de fluorescentie met de sterkste lichtbronnen, die de techniek ons levert en meetprincipes toepast, die bij veel geringere lichtintensiteiten metingen toelaten dan de gangbare methoden, is het mogelijk om op dit, ook voor de histologie veelbelovende terrein door te dringen.

## II. FLUORESCENTIEMICROSCOPIE.

Zoals reeds werd opgemerkt, heeft het gebruik van ultraviolet licht als opwekkende straling bij de studie van fluorescentieverschijnselen het voordeel, dat dit licht de waarneming niet stoort, ook al wordt het eventueel door het object verstrooid of gereflecteerd. Zo is fluorescentieanalyse haast synoniem geworden met analyse in ultraviolet licht en daardoor is de fluorescentiemicroscopie practisch de microscopie van fluorescentielicht, dat wordt opgewekt door ultraviolette stralen. Dat hierbij de opstelling zo kan zijn, dat de ultraviolette stralen wel degelijk storen, zal nog blijken. In ieder geval heeft het gebruik van deze stralen dan nog het voordeel, dat zij door een eenvoudig filter afdoende geëlimineerd kunnen worden. Dat er nog andere mogelijkheden zijn, bewijzen de onderzoeken over fluorescentiemicroscopie met blauw licht. Hierbij is echter een oculairfilter noodzakelijk, hetwelk dit blauwe licht tegenhoudt, zodat slechts een gedeelte van het toch reeds korte zichtbare deel van het spectrum voor de waarneming overblijft. In den regel zijn dus fluorescentieverschijnselen, die in het zichtbare deel van het spectrum vallen en door ultraviolette straling opgewekt kunnen worden, het onderwerp van macroscopisch en microscopisch onderzoek.

De voortgang der fluorescentieanalyse is dan ook ten nauwste

verbonden geweest met de vordering in de methode tot isolatie van ultraviolette stralen uit het licht van onze lichtbronnen. Daar de isolatie van het ultraviolette licht door middel van kwarts-monochromatoren niet voor algemeen gebruik in aanmerking kwam, werd het gebied der fluorescentieanalyse eerst goed ontsloten, toen er bruikbare filters in de handel kwamen. Wood en Lehmann ontwierpen vloeistoffilters, die in 1919 op voorstel van den eersten vervangen werden door nikkeloxyde bevattende glazen filters. Deze filters werden door Metzner ('28) in de microscopie ingevoerd en zijn tegenwoordig, gecombineerd met een kopersulfaat-cuvette voor de absorptie van de door het nikkeloxyde-glas doorgelaten rode stralen, de meest gebruikte ultraviolet-filters, daar de transmissie-curve op ideale wijze samenvalt met de emissie der voor fluorescentiedoeleinden het meest in aanmerking komende lichtbron: de kwiklamp in zijn diverse uitvoeringen.

Voordat er kwiklampen gebouwd werden met een grote oppervlaktehelderheid, kwam alleen de booglamp in aanmerking als ultraviolette lichtbron, voorzien van normale koolspitsen (Lehmann ('13)) of van ijzeren electroden (Haitinger ('38)). Vooral de uitvoering met speciale ijzeren electroden van Haitinger is gekenmerkt door een grote rijkdom aan ultraviolet licht bij een redelijk stroomverbruik en behoorlijke bedrijfszekerheid. De nieuwe types van hogedrukkwiklampen als de Philips H.P. 300 hebben echter een bijna even grote oppervlaktehelderheid bij gebruik als ultraviolette lichtbron en zijn nog eenvoudiger en constanter in het gebruik. (Melzer ('39), Haitinger ('40)).

Met de bespreking van de lichtbronnen en het filter is het integreerende deel van de opstelling voor fluorescentiemicroscopie vermeld. Toch moeten nog enige bijzonderheden van het microscoop zelf genoemd worden. (Hierover en over de lichtbronnen vindt men in de monographie van Haitinger verdere gegevens.)

De normale microscopiepiegel geeft belangrijke verliezen en kan het beste vervangen worden door een speciale „ultravioletspiegel” of door een totaal reflecterend prisma van kwarts. Bij het gebruik van de kwiklamp en het nikkeloxyde-filter is de overheersende golflengte in de ultraviolette straling die van de groep om 366 m $\mu$ . Deze golflengte wordt door gewoon glas vrijwel onverzwakt doorgelaten, zodat het uit dien hoofde niet noodzakelijk is om de condensor te vervangen door een exemplaar met lenzen van kwarts of van speciaal voor ultraviolet licht doorzichtig glas. De fluorescentie van glazen condensoren kan echter hinderlijk sterk zijn, zodat het gebruik van de genoemde andere condensoren soms toch aanbeveling verdient. Hetzelfde geldt voor het materiaal der objectglazen. Hier stuit men echter bij een wat groter materiaal op praktische bezwaren en bij de door ons gebruikte soort (qualiteit „halbweiss”) was de fluorescentie van het glas zeer gering (vgl. Danckwortt ('34)).



Bij de bouw der ultropak- en andere systemen voor belichting van boven af is met deze eisen van fluorescentievrijheid en doorgankelijkheid voor ultraviolet licht rekening gehouden.

Als insluitmiddel voor de coupes is canadabalsem door zijn fluorescentie ongeschikt. Bruikbaar zijn gedestilleerd water, glycerine van grote zuiverheid en bepaalde soorten paraffinum liquidum (Haitinger ('33), ('38)). Wij gebruiken paraffinum liquidum Ph. N. V., s.g. 0,875. Een nadeel is de afwijkende brekingsindex van die van glas; zij bedraagt nl. 1,433, doch in de practijk weegt dit nadeel niet op tegen de voordelen, die de paraffineolie biedt als inactief, niet fluorescerend insluitmedium. Als de ultraviolette stralen in het praeparaat de fluorescentie hebben opgewekt, is dat deel, dat niet geabsorbeerd is door de delen der coupe, waardeloos en zelfs, indien men geen bijzondere maatregelen neemt, schadelijk voor de waarneming. Als deze stralen nl. in het objectief binnendringen, ontstaat er in de materialen van dit lenzenstelsel en in onze oogmedia een fluorescentie, die de waarneming van het object storen kan. Het binnendringen der stralen in het objectief kan men voorkomen door het inrichten van de belichting, zoals bij de microscopie in het donkere veld, of door het aanbrengen van een filter tussen object en objectief, dat het ultraviolette licht tegenhoudt en het zichtbare licht doorlaat. De eerste methode is oneconomisch, vooral bij de sterke objectieven met grote numerieke apertuur, daar de corresponderende apertuur van de condensor door een centraal diaphragma van de belichting uitgeschakeld dient te worden. Deze overweging deed Lehmann zoeken naar een glassoort, die voldeed aan de volgende eisen: Absorptie van alle ultraviolette stralen bij de dikte van een normaal dekglas, geen absorptie in het zichtbare gebied, ontbreken van fluorescentie en bezit van de juiste brekingsindex. Aan deze eisen voldoet het beste het z.g. euphos-glas. Tegenwoordig ziet men er meestal van af om de fluorescentie in het objectief te onderdrukken en volstaat met een euphosfilter op het oculair. Voor spectrale onderzoeken aan zeer zwak fluorescerende praeparaten is het euphos-dekglas evenwel onmisbaar. Bij de toepassing van deze dekglazen behoeft de immersie-olie niet „fluorescentievrij” te zijn. Toch verdient het aanbeveling om ook hiervoor een blijvend niet-fluorescerend medium te gebruiken (de door ons geprobeerde „fluorescentievrije immersie-olie” bleef niet vrij van fluorescentie tijdens de waarneming), daar het bij de geringe grootte der euphosglasjes niet altijd te voorkomen is, dat iets van de immersievloeistof zich mengt met de paraffineolie, waarin het praeparaat is ingebed. Het is dus logisch en practisch om ook paraffineolie als immersievloeistof te gebruiken, niettegenstaande de afwijkende brekingsindex.

Tenslotte nog enkele woorden over de objecten van het onderzoek met het fluorescentiemicroscop. Haitinger onderscheidt primaire en secundaire fluorescentie, waarbij de primaire fluores-



centie die is van de onbehandelde weefsels en de secundaire die van met fluorescerende stoffen (fluorochromen) behandelde praeparaten. Een belangrijke tussenvorm is de fluorescentie, die door ingrepen met op zich zelf niet fluorescerende chemicaliën of door andere procedures in het praeparaat te voorschijn geroepen kan worden. Een geheel nieuw gebied van microscopisch-fysiologisch onderzoek werd geopend door de toepassing der fluorescentiemicroscopie met behulp van de ultropaksystemen op levende organen van al dan niet met fluorescerende vitale „kleurstoffen” behandelde dieren — een waarlijk zeer fraaie techniek. (Ellinger ('30), Hirt ('30), ('39), ('40), Wimmer ('39), Singer ('32) e.a.).

Voor een nadere uiteenzetting over de onderwerpen van het microscopisch fluorescentieonderzoek, speciaal voor zover bij deze onderwerpen de microspectrophotometrie een onmisbare aanvulling is, zij verwezen naar de beschouwingen op blz. 59 e.v.

### III. MICROSPECTROPHOTOMETRIE.

In de spectrophotometrie kan men enkele groepen van methoden onderscheiden:

- a. Methoden, waarbij de dispersie geschiedt door middel van prisma of rooster en de intensiteit der spectrumdelen visueel of langs lichtelectrische weg gemeten wordt (bijv. de König-Martense spectrophotometer);
- b. Methoden, waarbij de dispersie op dezelfde wijze geschiedt, het spectrum echter gefotografeerd wordt en de zwarting der plaat als maat voor de relatieve lichtintensiteiten dient (spectrophotograaf en microphotometerbank);
- c. Methoden, waarbij het licht door middel van filters in bepaalde golflengtegebieden ontleed en in den regel visueel gemeten wordt (bijv. de Pulfrich-Stufenphotometer).

Dezelfde types vindt men terug in de geschiedenis der microspectrophotometrie.

In 1881 ontwierp en gebruikte Waelchli een microspectrophotometrische opstelling, waarmede hij de lichtabsorptie van de gekleurde bolletjes in vogelretinae (objecten van 2—5 $\mu$ , doorsnede) onderzocht. Hij gebruikte een „microspectraaloculair” van Abbe en een normaal-kaars als standaardlichtbron. Een microspectraaloculair is een oculair, dat in het vlak van het diafragma een spleet van regelbare breedte bezit; scharnierend aan het bovenvlak is een rechtziend prisma bevestigd, zodat men na het opzoeken van het gewenste object en na het regelen der spleet dit prisma slechts op de oculairlens behoeft te klappen om het spectrum waar te nemen. De spleet is nog voorzien van een klein totaal reflecterend prisma, dat het mogelijk maakt om naast het onderzochte spectrum het

spectrum van een bekende lichtbron ter vergelijking te projecteren; terzijde van het prisma bevindt zich een golfengteschaal, die tegelijk met het te onderzoeken spectrum waargenomen kan worden.

De intensiteit van het licht der vergelijkingslichtbron veranderde Waelchli meetbaar door tussen de kaars en het spectraaloculair een matglaasje op te stellen en de afstand van kaars tot matglas te variëren. De intensiteiten van het standaardlicht, die hij door het spectraaloculair waarnam, waren dan omgekeerd evenredig met het kwadraat van de afgelezen afstanden tussen kaars en matglas. Het is bij deze metingen wenselijk om slechts dat gedeelte van het spectrum waar te nemen, dat gemeten wordt, opdat niet verschillen links en rechts van dit deel de uitkomst der meting beïnvloeden. Bij de meeste spectrophotometers is de inrichting dan ook zodanig, dat men door een tweede spleet, de oculairspleet, elk gewenst deel van het spectrum afzonderlijk kan bestuderen. Hierbij ziet men dus niet het gehele te onderzoeken spectrum en het gehele vergelijkingspectrum, doch slechts van beide spectra eenzelfde, beperkt, golfengtebereik en men kan de gelijkheid van de lichtintensiteiten van onderzocht en vergelijkingspectrum in dat golfengtebereik beoordelen zonder daarbij gehinderd te worden door eventuele ongelijkheden in de op dat ogenblik niet gemeten, andere, delen van het spectrum. Dit is evenwel bij een microspectraaloculair, waarbij van de collimatorspleet door de optiek een virtueel beeld gevormd wordt, niet mogelijk. Het pleit voor den waarnemer, dat hij door eenvoudige fixatie van het gewenste deel van het spectrum die mate van nauwkeurigheid heeft weten te bereiken, welke uit zijn opgaven blijkt.

Dat dit systeem op den duur niet voldeed, spreekt evenwel vanzelf en enige jaren later ontwierp Engelmann ('88) een speciale microspectrophotometer. Dit apparaat was voorzien van een regelbare oculairspleet, zodat elk gewenst gedeelte van het spectrum geïsoleerd gemeten kon worden. In principe minder fraai dan bij de hiervoor beschreven opstelling, was de wijze waarop het licht van het vergelijkingsspectrum meetbaar gevarieerd werd: dit geschiedde door verandering van de breedte van de collimatorspleet voor dit spectrum (Vierordt's principe). Bij het toestel van Engelmann was de collimatorspleet n.l. gescheiden in twee, in elkaars verlengde liggende spleten, die elk meetbaar en symmetrisch te verstellen waren. De ene spleet diende voor het te onderzoeken licht en werd al naar behoefte ingesteld, de andere ontving licht uit de standaardlichtbron. De intensiteit van het door deze laatste spleet doorgelaten licht is recht evenredig met de breedte, die afleesbaar is. Het is duidelijk, dat bij, ten opzichte van de dispersie van het prisma, grote spleetbreedten de verschillen tussen de beide collimatorspleten ook onderscheid in de „reinheid” der vergeleken spectra veroorzaken. Voor metingen aan de weinig lichtsterke fluorescentieverschijnselen is deze methode dan ook niet aan te bevelen.



Een microspectrographische methode beschrijft Wychgram ('12). Hij bouwde op een microspectraaloculair een photographisch opzetstuk en verving de oculairlens van het spectraalapparaat hiertoe door een achromaat of photographeerde het spectrum eenvoudig met een photographisch objectief, daarbij het photographisch apparaat boven het spectraaloculair houdend in plaats van het oog. Uit niets blijkt evenwel, dat hij bij de zo verkregen spectra ook photometrisch de zwarting bepaald heeft.

R. Fürth vermeldt een opstelling voor het meten der kleuren van door ultramicroscopische deeltjes teruggekaatst en afgebogen licht, waarbij de golflengtebereiken uitgezeefd werden door combinaties van vloeistoffilters. Daar dit uitzeven van golflengten hier evenwel geschiedt voordat het licht het object bereikt, komt deze methode voor toepassing op fluorescerende microscopische objecten niet in aanmerking.

Wel wordt hiervoor een ander systeem, dat met filters werkt, aanbevolen: het „photometeroculair” (Haschek en Haitinger ('33)), een inrichting voor visuele photometrie, geschikt voor bepalingen aan microscopische objecten. Door gebruik van filters kan men met dit apparaat ook kleurbepalingen verrichten, op dezelfde wijze als dat voor macroscopische objecten met een „Stufenphotometer” mogelijk is.

In de laatste jaren zijn nog enkele mededelingen verschenen over absorptie-spectrophotometrie aan microscopische objecten. Vlès en Gex ('28) beschrijven de toepassing van hun micro-ultraviolet-spectrograaf op het onderzoek van eicellen. Hasskó en Lassmann ('36) onderzochten de absorptie van oxyhaemoglobine in zeer kleine celonderdelen (afm.  $0,12 \mu$ .) door de cellen met een microscoop te projecteren op een scherm, waarin zich een spleetje bevond. De door deze spleet doorgelaten stralen werden in een König-Martense spectrophotometer geleid en gemeten. Een licht-electrische methode geeft Caspersson aan; hij onderzocht hiermede de ultraviolette absorptie van de chromosomen-eiwitten van de sprinkhaan ('40). Tenslotte wordt in het Zeitschr. f. Wiss. Mikr. een artikel vermeld van Cole en Brackett ('40) over de absorptie-spectra van erythrocyten, doch het betreffende no. van de Physic. Rev. is nog niet voorhanden.

Alle genoemde methoden waren bedoeld voor metingen met doorvallend licht. De lichtsterkten, die hierbij gemeten worden, zijn vele malen groter dan die, welke bij onderzoek aan niet met fluorochromen behandelde cellen gevonden worden. Inderdaad leent geen der bovenstaande methoden zich zonder meer voor toepassing op het fluorescentieonderzoek. Een nadere bespreking van elk dezer methoden is dan ook overbodig, te meer waar in het volgende hoofdstuk nog een kritische discussie gegeven zal worden van de toepassingsmogelijkheden der drie op blz. 8 genoemde hoofdgroepen bij het fluorescentieonderzoek.

De enige onderzoeker, die het belang van het spectrophoto-

metrisch onderzoek in de fluorescentiemicroscopie nadrukkelijk vermeldt, is Policard ('25). Hij beveelt, als eenvoudig en voor verbetering vatbaar hulpmiddel, een opstelling aan, die overeenkomt met die van Waelchli en waaraan dus dezelfde, op blz. 9 aangeduide nadelen kleven, doch waarbij het licht voor het vergelijkings-spectrum geleverd wordt door een nitralamp en meetbaar gevarieerd wordt door een combinatie van een vaste en een draaibare nicol. Hij geeft enige curven: van vaseline, van kraakbeen en van follikelvloeistof. Histologische onderzoekingen, met deze opstelling verricht, zijn niet bekend geworden.

Dhéré ('34) beschrijft het prachtige universele „microspectraal-apparaat” van Königsdörffer, dat gelegenheid biedt tot spectroscopisch en spectrophotographisch onderzoek (men zie ook bij Borst en Königsdörffer ('29)), doch voegt er aan toe, dat nog geen quantitative uitkomsten, hiermede verkregen, gepubliceerd zijn.

Charlotte Kern ('26) onderzocht de spectra van fluorescerende stoffen bij donkerveld-belichting en geeft een microspectrogram van rhodamine; v. Euler c.s. ('35) namen met een eenvoudige opstelling, bestaande uit een zakspectroscop en een kleine photographische camera door een microscoop de fluorescentiespectra op van de n. opticus, de lens en het glaslichaam dicht bij de retina van het oog van een vis. In geen van deze gevallen werd evenwel de zwarting der negatieven gemeten en medegedeeld, zodat de genoemde spectrogrammen niet meer zijn dan spectroscopische documenten en niet als spectrophotometrische gegevens beschouwd kunnen worden.

Uit het voorgaande blijkt dus, dat in feite niet één spectrophotometrische bepaling van de eigen, „primaire”, fluorescentie van cellen of celonderdelen bekend is geworden. In de mij toegankelijke literatuur ontbrak op dit punt elk gegeven.

#### IV. EIGEN METHODE.

##### Inleiding.

De opwekking van fluorescentieverschijnselen kan in het algemeen geschieden met licht van elke golflengte, korter dan die der fluorescentiestraling, indien deze golflengte door de fluorescerende stof geabsorbeerd wordt. De fluorescentiesterkte is daarbij evenredig met de intensiteit van het ingestraalde licht. Niet alle geabsorbeerde energie wordt echter omgezet in fluorescentielicht: het rendement is kleiner dan 1. Een deel der geabsorbeerde energie wordt blijkbaar omgezet in kinetische energie der moleculen of in andere, voor ons nog onbekende energievormen. In verband hiermede moet gewezen worden op het verschijnsel van uitdoving der fluorescentie. In het algemeen hebben gelijksoortige moleculen een uitdovende werking op elkaars fluorescentie, zodat in een oplossing



van fluorescerende moleculen de fluorescentie niet evenredig met de concentratie dezer moleculen toeneemt. Een dergelijke werking hebben ook sommige vreemde moleculen op de emissie van fluorescerende stoffen. Men noemt deze moleculen in de Franse literatuur „inhibiteurs” (J. en F. Perrin ('27) en verder Hirschlaff ('38)). Gewoonlijk doven deze inhibiteurs de fluorescentie min of meer uit zonder verandering van het fluorescentiespectrum. In hoeverre er bij de fluorescentiemicroscopie van weefselcoupes met deze uitdovende stoffen rekening gehouden moet worden, is onbekend. Voor bloedserum hebben Boutaric ('35) en Zuckerkandl ('37) aangetoond, dat in bijzondere gevallen de fluorescentie van fluoresceïne-zouten wordt uitgedoofd. Ook zonder dat men zijn toevlucht neemt tot deze uitdoving kan men de geringe intensiteit der in coupes waargenomen eigen fluorescentie geredelijk verklaren uit de geringe absorptie der opwekkende straling. Voor enkele synthetische kleurstoffen toonden Wawilow e.a. (geciteerd naar Hirschlaff) aan, dat binnen het absorptiegebied dezer stoffen het rendement min of meer constant is, doch het is niet zeker, of dit voor alle stoffen geldt. Zo vond Josephy ('34) dat met de sterk geabsorbeerde ultraviolette straling van 270  $\mu$ , in een lactoflavine-oplossing nauwelijks enige fluorescentie kon worden opgewekt, terwijl bestraling met de golflengte 445  $\mu$ , die minder sterk geabsorbeerd wordt, duidelijke fluorescentie te voorschijn riep.

De spectrale verdeling van het fluorescentielicht is volkomen onafhankelijk van de golflengte van de opwekkende straling, zoals Goldstein ('11) en Starckiewicz ('29) voor synthetische organische verbindingen en Aharoni en Dhéré ('30) voor aetioporphyriene konden aantonen. Blijkbaar kan de opwekkende straling, van welke golflengte deze ook zij, bij deze stoffen slechts één, door de bouw der moleculen volkomen vastgelegde, toestand van excitatie veroorzaken. De terugkeer van deze toestand tot de rustphase verloopt eveneens volgens één zeer bepaalde combinatie van energieovergangen, hetgeen zich uit in de constantheid van de samenstelling der fluorescentiestraling.

Deze regel geldt natuurlijk niet voor mengsels van fluorescerende stoffen, zoals die in de natuur vaak zullen worden aangetroffen.

Hierbij is het n.l. heel goed mogelijk, dat bij de opwekking van de fluorescentie door monochromatisch licht van de ene golflengte de component a het grootste deel van de opwekkende stralen omzet in fluorescentielicht en bij opwekking door een andere golflengte de component b. Het spectrum van het fluorescentielicht van het mengsel zal in het eerste geval de meeste gelijkenis vertonen met dat van a, in het tweede geval met dat van b. Hieruit volgt, dat het gewenst is bij opgave over fluorescentiespectra van stoffen, waarvan de zuiverheid niet vaststaat, de gebruikte opwekkende golflengte mede te delen en dat de vergelijking der fluorescentiespectra van één stof bij verschillende opwekkende golflengten aanwijzingen kan geven omtrent de zuiverheid der stof.



De fluorescentiespectra van de organische verbindingen bestaan bij gewone temperatuur nooit uit de haarscherpe lijnen, die ons uit de anorganische emissiespectra bekend zijn, doch voorzover dat tot nog toe gebleken is, uit min of meer vage banden. Van sommige stoffen ligt de emissie uitsluitend in het ultraviolette deel van het spectrum, van vele evenwel, althans gedeeltelijk, in het zichtbare gebied.

Bij de studie van de fluorescentie van vele stoffen blijken de ultraviolette stralen nog op andere wijze werkzaam te zijn dan als fluorescentie-opwekkers. Vooral de gecompliceerde organische verbindingen kunnen zeer gevoelig zijn voor de inwerking van deze stralen en tot de gevolgen der bestraling behoren ook veranderingen in de intensiteit en de spectrale samenstelling van het fluorescentielicht. Deze veranderingen in het fluorescentielicht van papier, gelatine enz. beschrijft Liesegang ('26). Wat betreft de intensiteitsveranderingen vindt men op dit punt verder waarnemingen van Wels ('28) aan eiwitoplossingen, van Wels en Jokisch ('29) aan weefsels en cellen en aan oplossingen van aminozuren van Wiegand ('29). Erös ('32) vermeldt de ook door mij geregeld waargenomen afname der fluorescentie in weefselcouples en Querner ('35) noemt de „deluminescentie” als een van de kenmerken van zijn „Leuchtstoff X”. Andere voorbeelden zijn de vorming van 't groen fluorescerende urobilinezink uit rood fluorescerende porphyrinezink-oplossingen (Gouzon ('33)) en van lumiflavine uit lactoflavine (Bierry en Gouzon ('35) geven voor dit geval de verandering in het fluorescentiespectrum). In sommige gevallen kan men door doeltreffende keuze der opwekkende straling deze destructieve invloed met behoud van de fluorescentie ontgaan (Jäger ('40) voor het geval van vitamine A); in andere gevallen evenwel zal de meting van het fluorescentiespectrum moeten geschieden vóórdát zich een merkbare verandering heeft voorgedaan. De methode van Dhéré ('32, '37), die in dergelijke gevallen de onderzochte stof herhaaldelijk ververste, leent zich alleen voor spectrographisch onderzoek en in het geheel niet voor histologische gevallen.

Overwogen wij thans aan de hand van deze gegevens, aan welke voorwaarden een microspectrophotometrische opstelling voor onderzoek van fluorescerende objecten moet voldoen, dan blijkt, dat:

- a. De opwekkende stralen zo sterk moeten zijn als de lichtbron c.q. het object toelaat;
- b. de opwekkende straling monochromatisch en van bekende golflengte moet zijn;
- c. de meting van zeer geringe lichtintensiteiten mogelijk moet zijn;
- d. de meting snel uitgevoerd moet kunnen worden.

Hieraan moet nog als belangrijke eis worden toegevoegd:

- e. De methode moet uitkomsten opleveren, die kwantitatief vergelijkbaar zijn met die der gangbare macroscopische onderzoekingsmethoden.

Tot op zekere hoogte als concessie kan gelden, dat:

- f. de oplossing van de spectra niet zo streng behoeft te zijn, als bij de analyse van vlamspectra regel is.

(De eis e. verdient enige toelichting: Indien wij metingen verrichten met een op blz. 8 onder c. genoemde methode — met een filtermethode dus — dan is het door ons onderzochte licht gekenmerkt door de transmissiecurven van de daarbij gebruikte filters. Aangezien deze curven geen regelmatige geometrische figuren zijn, die een nauwkeurige opgave toelaten van het door deze filters doorgelaten licht, zijn onze gegevens slechts van waarde voor den onderzoeker, die over een identiek stel filters beschikt. Beschikt hij over een andere methode, dan zijn onze gegevens voor hem waardeloos. Meten wij evenwel met een onder a. genoemde methode, dan kunnen de onderzochte delen van het spectrum nauwkeurig worden aangegeven door de vermelding van de verhouding tussen de breedten van collimator- en oculairspleten tot de dispersie van het prisma. Deze opgaven zijn volmaakt onafhankelijk van de bouw of de grootte van het gebruikte apparaat en iedere onderzoeker, die de een of andere prisma- of roosterspectrophotometer bezit, kan zijn instrument instellen op de door ons gebruikte waarden en dus metingen verrichten, die volkomen vergelijkbaar zijn met de onze. Doet hij dit niet en meet hij met andere spleetbreedten, dan heeft hij uit onze opgaven toch in ieder geval reeds een indruk van de overeenkomst, die hij tussen zijn en onze waarnemingen mag verwachten).

Het is bezwaarlijk om in een practisch bruikbare opstelling zowel aan a als aan b te voldoen. Monochromatisering bereikt men bij een lichtbron met een continu spectrum slechts met een dubbele prismamonochromator of bij een lichtbron met een lijnspectrum in sommige gevallen met filters. Zo kan men met een voldoende dik nikkeloxyde-glas-filter, gecombineerd met een kopersulfaatcuvette, uit de straling van een gewone kwikontladingslamp de lijngroep 365,0—366,3  $m\mu$ , dus practisch monochromatisch licht, isoleren (Dhéré ('34)). De oppervlaktehelderheid dezer bij lage druk brandende kwiklampen is evenwel te gering voor metingen bij sterke vergrotingen van de fluorescentie van dunne weefselcoupes. Daarvoor komt in aanmerking de superhogedrukkwiklamp, type Philips H.P. 300 en eerst recht de superhogedrukkwiklamp type Philips S.P. 500. Slechts bij toepassing van deze laatste lamp zijn metingen aan onderdelen van cellen in dunne, niet met fluoro-



chromen behandelde, weefselcoupes mogelijk. De totale lichtstroom van de S.P. 500 bedraagt 30.000 lumen, de lengte van de ontlading 12,5 mm en de breedte ongeveer 2,5 mm. De overeenkomende waarden voor de H.P. 300 zijn: lichtstroom 3000 lumen, lengte der ontlading 25 mm en breedte ongeveer 5 mm. Hoewel het verschil in de spectrale samenstelling van het door deze lampen uitgezonden licht een exacte vergelijking niet mogelijk maakt, is het duidelijk, dat de oppervlaktehelderheid van de S.P. 500 die van de H.P. 300, ook bij gebruik als ultraviolette lichtbron, vele malen moet overtreffen. Aangezien Haitinger ('40) opmerkt, dat de oppervlaktehelderheid van lampen als de H.P. 300 praktisch niet bij die van zijn ijzer-electroden-booglamp ten achter staat, mag worden aangenomen, dat wij met de S.P. 500 de sterkste ultraviolette lichtbron in de histologische techniek hebben ingevoerd, die tot nu toe vervaardigd is.

Bij deze lichtbronnen is de spectrale verdeling van het uitgezonden licht evenwel niet gelijk aan die der genoemde, bij lage druk werkende, lampen. Marie Wreschner ('38) ontleent curven aan metingen van Elenbaas en van Wijk, waaruit blijkt, dat bij de S.P. 500 de kwiklijnen zich verbreed hebben tot banden en dat zich tussen die banden een niet te verwaarlozen continuum bevindt. Bij pogingen om door strenge filtering of door middel van een monochromator hieruit een monochromatische straling te isoleren wordt het voordeel van de enorme helderheid van deze lamp te niet gedaan, zodat de straling, die meetbare fluorescentie in onbehandelde weefselcoupes opwekt, slechts bij benadering monochromatisch kan zijn. Een filter, bestaande uit een 6 cm dikke laag van een 5% kopersulfaatoplossing in water en uit twee lagen van 2,5 mm nikkeloxyde-glas, laat van het spectrum der S.P. 500 het licht van 360 tot 380  $m\mu$  in grote sterkte door en, zeer verzwakt, de banden bij 334 en 313  $m\mu$ . Dat geen licht van grotere golflengte dan 400  $m\mu$  wordt doorgelaten kon ik spectroscopisch vaststellen, terwijl de verzwakking der golflengten, korter dan 360  $m\mu$ , mij bleek bij de combinatie van een Bäckström-filter, dat alleen deze golflengten doorlaat, met het bovengenoemde filter van kopersulfaatoplossing en nikkeloxyde-glas.

Een dergelijke tegenstrijdigheid tonen de voorwaarden, die de meettechniek zelve betreffen. Stelt men de eis e. voorop, dan is het duidelijk, dat alleen methoden met prismatische of roosterdispersie in aanmerking komen. De uitkomsten van photometrische bepalingen door filters kunnen immers wel op dezelfde wijze verwerkt worden als die der bovengenoemde methoden (Eisenbrand ('34)), doch behouden altijd een onzekere factor, daar het door filters doorgelaten licht niet zo nauwkeurig gedefinieerd kan worden als het licht, dat door de oculairspleet van een spectrophotometer valt. Daar in het algemeen geen scherp omschreven lijnen in het spectrum te verwachten zijn, kan men met prismatische dispersie volstaan. Bij de grote dispersie over het gehele spectrum der



roosterspectroscopen zijn metingen immers toch niet mogelijk door de geringe intensiteit van de fluorescentieverschijnselen.

Wat de keuze der registratiemethode betreft is het volgende op te merken: De spectrographie is een zeer gevoelige methode door de summatieve werking van de photographische plaat. Zoals echter reeds werd uiteengezet, is het bij het microscopisch onderzoek niet mogelijk om tijdens de belichting veranderde objecten te vervangen door nieuwe, zoals dat bij de macroscopische fluorescentiespectrographie geschiedt. Daarom is de spectrographie als algemene methode niet geschikt voor het microscopisch fluorescentieonderzoek aan biologische objecten.

De lichtelectrische en thermoelectrische registratiemethoden (resp. met „Sperrschichtzelle” en vacuumthermoelement) hebben het voordeel, dat hun werkingssfeer zich niet beperkt tot het zichtbare spectrum en dat zij objectief registreren. De gevoeligheid dezer methoden is echter slechts onder bijzondere omstandigheden gelijk aan die van ons oog of nog groter (Tomaschek ('35)), zodat voor practisch gebruik de toepassing der visuele registratie vooralsnog aangewezen blijft, in weerwil van de nadelen: het kleine gebied van grote gevoeligheid en de subjectiviteit van de waarneming. Het nadeel van het geringe meetbereik van de visuele methode weegt echter niet zo zwaar, daar het grootste gedeelte van de hedendaagse kennis omtrent fluorescentieverschijnselen juist die verschijnselen betreft, waarvan de golf lengten, althans gedeeltelijk, binnen het meetbereik vallen.

In overeenstemming met deze overwegingen kozen wij een methodiek, waarbij het fluorescentielicht bij relatief geringe dispersie visueel spectrophotometrisch onderzocht werd. Aan een nauwkeurige beschrijving van deze methodiek laten wij enkele beschouwingen, die de keuze van bepaalde details motiveren, voorafgaan.

Allereerst het spectroscopische deel der apparatuur. Zoals reeds werd opgemerkt, behoeft de spectrale oplossing bij het fluorescentieonderzoek aan de meeste organische stoffen niet groot te zijn. Dit veroorlooft ons het gebruik van relatief weinig dispergerende spectroscopen. Voor de isolatie van het gewenste spectraalgebied is het noodzakelijk, dat de niet gemeten delen van het spectrum afgeschermd kunnen worden: de spectroscop moet voorzien zijn van een oculairspleet. Zakspectroscopen en microspectraaloculairen, waarbij van de collimatorspleet alleen op de retina een reëel beeld ontworpen wordt, zijn dus niet bruikbaar. De relatieve opening van de afbeeldende optiek in de spectroscop moet minstens even groot zijn als die van het lenzenstelsel, dat het object op de collimatorspleet afbeeldt, anders treden verliezen op, die hier zwaar wegen.

Ook met spectroscopen van geringe dispersie kunnen microscopische fluorescentieverschijnselen slechts met grote spleetbreedten gemeten worden. Een analyse van de „reinheid” van het



onder deze omstandigheden door de oculairspleet waargenomen deel van het spectrum geeft het volgende beeld: Zij  $C_a$  het beeld van de collimatorspleet in het vlak van de oculairspleet bij de golflengte a,  $C_b$  dat bij de golflengte b en  $C_c$  dat bij de golflengte c. Valt nu bij een bepaalde stand van het prisma de as van  $C_a$  samen met die van de oculairspleet O en beschouwen wij de verhoudingen voor het eenvoudige geval, dat O even breed is als  $C_a$  dan is het duidelijk, dat al het in het spectrum aanwezige licht van de golflengte a door O het oog bereikt. Stel, dat de as van  $C_b$  door de andere breking in het prisma valt op de rand van O, dan zal slechts de helft van het licht van de golflengte b doorgelaten worden. Valt  $C_c$  net naast O, dan zal van de golflengte c in het geheel geen licht door de oculairspleet vallen. Nu zijn  $C_a$ ,  $C_b$  en  $C_c$  alle even breed en er volgt uit het voorgaande, dat het aandeel, dat elke golflengte levert aan het door O doorgelaten licht, lineair afneemt met de afstand, waarop die golflengte in het spectrum verwijderd ligt van de maximaal doorgelaten golflengte. Immers, de as van  $C_b$  viel op de rand van O, dus op een afstand van  $\frac{1}{2}$ . O van a en van  $C_c$ , die net naast O viel, op een afstand van 1.0 van a, terwijl b voor de helft vertegenwoordigd was in het door O doorgelaten licht en c in het geheel niet. Het verloop van de dispersiekromme van het prisma heeft echter als gevolg, dat in werkelijkheid de afstanden tussen a, b en c niet gelijk zijn. De hierboven afgeleide verhouding geldt dan ook slechts bij benadering en voor kleine verschillen tussen de golflengten a, b en c. Het is duidelijk, dat — op deze benadering na — het gemeten licht door de vermelding van de bij de meting gebezigde spleetbreedten volledig gekarakteriseerd is, waardoor aan de belangrijke voorwaarde, dat de metingsuitkomsten fysisch welomschreven moesten zijn, beter wordt voldaan dan bij de uitzeving van analoge spectrumdelen door middel van filters mogelijk is.

Meet men met vaste collimator- en oculairspleet, dan wisselt bij de metingen in de verschillende golflengtegebieden voortdurend de reinheid van het onderzochte spectrum. Immers, het beeld van de collimatorspleet is bij de verschillende standen van het prisma constant van grootte, terwijl de dispersie van het rood naar het blauw gestadig toeneemt. Daardoor zal in het blauw de golflengte, die niet meer door de oculairspleet wordt doorgelaten, veel minder verschillen van de maximaal doorgelaten golflengte dan in het rood. Weliswaar is het mogelijk voor elke golflengte voor één vaste waarde van C en O de reinheid van het door O doorgelaten deel van het spectrum te definiëren, doch het is veel eenvoudiger om bij de meting van elke golflengte C en O een dusdanige waarde te geven, dat de reinheid van het onderzochte licht over het gehele spectrum constant is. Hiertoe kan men de verhoudingen kiezen zoals die boven zijn uiteengezet en dus O gelijk houden



aan C en beide een waarde geven, welke overeenkomt met de afstand, waarop in het betreffende deel van het spectrum twee lijnen, met een golflengteverschil van bijv. 20  $m\mu$ , van elkaar verwijderd liggen. Uit de bovenvermelde verhoudingen blijkt dan, dat in dat geval slechts één golflengte maximaal aanwezig is in het onderzochte licht, de golven, die 10  $m\mu$  langer of korter zijn, slechts voor de helft vertegenwoordigd zijn, en die van 20  $m\mu$  verschil met de maximaal doorgelaten golflengte er in het geheel niet in voorkomen. In het gebied van grote dispersie zullen O en C hiertoe groter moeten zijn dan in dat van geringe dispersie. Bij het voordeel van de gelijkblijvende reinheid van het spectrum komt dus nog dat van de toenemende lichtsterkte in het blauw. Door verbreding van de oculairspleet neemt immers het gemeten lichtvlakje toe in grootte, terwijl door de verbreding van de collimatorspleet de lichtintensiteit van dit vlakje groter wordt dan zij bij vaste spleten zou zijn. Deze toename in het blauwe deel van het spectrum is bijzonder welkom, daar de gevoeligheid van het oog in dit gedeelte juist geringer is dan in het geel en het groen. Een belangrijk nadeel van de prismaspectroscopen, dat van de ongelijkmatige dispersie, wordt op deze wijze geëlimineerd. Een bezwaar van de veranderlijkheid van de collimatorspleet is de eis, dat de verlichting van deze spleet, zowel door het object als door de vergelijkingslichtbron, ook bij de grootst mogelijke spleetbreedte volkomen gelijkmatig moet zijn. Is dit niet het geval, dan bestaat de mogelijkheid, dat bij de vergroting van de spleetbreedte de intensiteit van het licht uit het object niet op gelijke wijze toeneemt als die van het vergelijkingslicht, met de daaruit voortvloeiende onnauwkeurigheid in de meting. In de praktijk kan men deze onnauwkeurigheid vermijden door voor de meting slechts objecten te kiezen, waarvan het beeld het werkzame deel van de collimatorspleet, ook in de wijdste stand, geheel en gelijkmatig opvult. Door de grootte van de collimatorspleet, die, behalve door de constructie van de spectroscop, bepaald wordt door de boven vermelde overeenkomst met 20  $m\mu$  dispersie, en door de mate van de vergroting, die het object ondergaat, voordat het op de collimatorspleet geprojecteerd wordt, is dus tevens de grootte van het object, die nog metingen toelaat, vastgelegd.

De wetenschap, dat bij een dergelijke opstelling de onderzochte delen van het spectrum niet uit monochromatisch licht bestaan, doet er ons voor waken grote waarde te hechten aan gegevens, die verkregen zijn in gedeelten, waar de spectrale samenstelling van gemeten licht en standaardlicht sterk uiteenlopen. In die delen van het spectrum, waar plotselinge overgangen in helderheid voorkomen, kan het resultaat van de vergelijking tussen fluorescentielicht en standaardlicht zeer onbetrouwbaar zijn.

Aangezien ons oog slechts in staat is tot het waarnemen van verschillen en niet tot metingen, moet telkens naast het onderzochte deel van het spectrum een corresponderend licht van gelijke



golfenlengte ter vergelijking worden aangeboden. Varieert men de sterkte van dat licht, dan zal ons oog binnen zekere grenzen wel in staat zijn om aan te geven, wanneer beide lichtsoorten — gemeten licht en standaardlicht — even sterk zijn. De hiervoor benodigde intensiteit van het standaardlicht kan worden afgelezen.

In den regel worden standaardlicht en te meten licht bij de visuele spectrophotometrie op de volgende wijze vergeleken: de lichtsoorten vallen ieder op een deel van de collimatorspleet, worden door het prisma gedispergeerd en door bijzondere optische inrichtingen in twee aan elkaar grenzende velden in de oculairspleet geprojecteerd. In de stralengang van één of van beide lichtsoorten is een inrichting tot meetbare variatie der intensiteit aangebracht. Bij gelijkheid der lichtintensiteiten in de beide velden verdwijnt de scheidingslijn.

Voor metingen aan fluorescentieverschijnselen is deze methode evenwel niet goed bruikbaar, daar hierbij intensiteiten gemeten moeten worden, die een scherp waarnemen van de scheidingslijn tussen de velden niet veroorloven. Slechts na langdurige adaptatie wordt bij deze metingen de oculairspleet zichtbaar en van het onderscheiden van details is geen sprake. In ander verband toonden Vermeulen en Hagedoorn ('36) aan, dat visuele vergelijking van twee intensiteiten ook mogelijk is door successief contrast. Hierbij valt het standaardlicht afwisselend met het te onderzoeken licht op eenzelfde, eventueel peripheer, retinadeel. Weliswaar is de nauwkeurigheid geringer dan die bij simultaancontrast (Vermeulen en Hagedoorn, Haas ('26)), doch de methode laat metingen toe bij intensiteiten, die anders niet meetbaar zijn. Hetzelfde principe is door ons toegepast op de spectrophotometrie van microscopische fluorescentieverschijnselen. Een eenvoudige inrichting met een spiegeltje, dat bewogen wordt door middel van een, uit de fotografie welbekende, draadontspanner, maakt het mogelijk snel van de observatie van het licht uit de vergelijkingslichtbron over te gaan op die van het fluorescentielicht. Na enige oefening is het heel goed mogelijk, door variatie van de intensiteit van het standaardlicht, een waarde te vinden, waarbij beide lichtintensiteiten gelijk zijn.

Aan de bespreking van de wijze, waarop de variatie van de intensiteit van het standaardlicht tot stand moet komen, mag een korte uiteenzetting van de berekening, die aan de vergelijking van onderzocht spectrum en vergelijksspectrum in het algemeen ten grondslag ligt, voorafgaan, daar hieruit de gewenste eigenschappen van de voornaamste verdere onderdelen der apparatuur vanzelf volgen.

Laten wij derhalve, zonder ons voorlopig te bekommeren over de juiste wijze, waarop de variatie van het standaardlicht geschiedt, aannemen, dat de intensiteit van dit licht afleesbaar is op een schaalverdeling, en dat deze schaal zo is ingericht, dat het standaardlicht bij de stand van de wijzer op 2 of op 3 ook inder-



daad 2 resp. 3 maal zo groot is als bij de stand 1, m.a.w., dat de intensiteit van het standaardlicht evenredig is met de aflezing.

Stel, dat bij een meting deze aflezing bedraagt  $\alpha$  voor het golflengtebereik a,  $\beta$  voor het bereik b enz., dat de intensiteit van het standaardlicht bij de aflezing 1,  $i_a$  erg/sec.  $\text{cm}^2$  is voor het bereik a,  $i_b$  erg./sec.  $\text{cm}^2$  voor het bereik b enz., dan is dus de intensiteit (I) van het gemeten licht in het golflengtebereik a:  $I_a = \alpha \cdot i_a$  erg/sec.  $\text{cm}^2$  en voor het bereik b:  $I_b = \beta \cdot i_b$  erg/sec.  $\text{cm}^2$ . Veronderstelt men verder, dat door de aanwezigheid van filters, reflecterende vlakken, niet-achromatische lenzenstelsels e.d. zowel de samenstelling van het te meten licht als die van het standaardlicht gewijzigd wordt, voordat deze lichten vergeleken kunnen worden, dan kan in de formule deze invloed worden weergegeven door een eigen factor voor elke golflengte:

$$I_a = \alpha \cdot i_a \cdot x_a, \quad I_b = \beta \cdot i_b \cdot x_b \text{ enz. erg/sec. cm}^2 \quad (1)$$

Absolute metingen vallen buiten het kader van deze onderzoeken: van de standaardlamp zijn de absolute lichtwaarden niet bekend. Bekend zijn slechts verhoudingen tussen intensiteiten van spectrumdelen, en deze verhoudingen zijn constant, of men nu veel of weinig licht van de lamp voor de meting gebruikt. Dit kan worden weergegeven door het invoeren van een voor alle golflengten constante factor C in de formule (1):

$$I_a = \alpha \cdot i_a \cdot x_a \cdot C, \quad I_b = \beta \cdot i_b \cdot x_b \cdot C \text{ enz. erg/sec. cm}^2 \quad (2)$$

In deze formule zijn  $\alpha$ ,  $\beta$  enz. bekend, C de genoemde constante, terwijl de waarden der producten  $i_a \cdot x_a$ ,  $i_b \cdot x_b$  enz. bepaald worden door ijking (zie blz. 29).

Uit het voorgaande blijkt, dat bij de variatie van de intensiteit van het standaardlicht de spectrale samenstelling hiervan ongewijzigd moet blijven. Zou immers het standaardlicht bij de aflezingen  $\alpha$  en  $\beta$  anders van samenstelling zijn dan bij de aflezingen  $2\alpha$  en  $2\beta$ , dan zouden de factoren  $x_a$  en  $x_b$  niet voor alle aflezingen constant zijn, en dus een berekening van de metingsuitkomsten onmogelijk worden. Bovendien is het van voordeel, als de mate van lichtverzwakking niet door ijking behoeft te worden vastgesteld en als de verhoudingen der schaaldelen dadelijk die der doorgelaten intensiteiten weergeven. Tenslotte dient ervoor gezorgd te worden, dat de optiek, die het standaardlicht aan de collimatorspleet toevoert, een apertuur heeft, die overeenkomt met die van de optiek, die het fluorescerende object afbeeldt op de collimatorspleet, daar anders het verschil in de subjectieve indruk van beide lichten de nauwkeurigheid der metingen beïnvloedt. Indien men n.l. de opstelling zó maakte, dat alle stralen van het standaardlicht onder zeer kleine hoeken met de optische as de collimatorspleet bereikten, dan zouden allerlei stofjes e.d. op de oppervlakken der lenzen mede afgebeeld worden op de



retina en zo het subjectieve beeld van de oculairspleet bij het observeren van het standaardlicht geheel anders doen zijn dan bij de observatie van het onder grotere hoeken invallende fluorescentielicht.

Toepassing van de „afstandswet” (verlichting is omgekeerd evenredig met het kwadraat van de afstand), zoals Waelchli deed, ware mogelijk, doch is bij kleine afstanden weinig nauwkeurig en bij grote onpractisch. Van de andere bekende methoden voor meetbare lichtverzwakking voldoet die der sneldraaiende en verstelbare sectoren aan de genoemde eisen, doch bij gebruik van door wisselstroom gevoede lichtbronnen treden hinderlijke interferentievervalsingen op. Bij meetbare uitdoving van het licht der standaardlamp met behulp van nicols (Policard ('25)) wordt gepolariseerd standaardlicht vergeleken met niet gepolariseerd fluorescentielicht, hetgeen een onzekere factor in de uitkomsten brengt. Het is n.l. niet bekend, of bij zeer geringe intensiteiten de verhouding tussen de indrukken, die door gepolariseerd en niet gepolariseerd licht worden teweeggebracht, wel voor alle golflengten constant is. De onzekerheid wordt nog vergroot door de niet onbelangrijke polarisatie, die in prismaspectroscopen optreedt. Tracht men deze moeilijkheden te ontgaan door beide lichtsoorten te polariseren, zoals in de spectrophotometer volgens König-Martens geschiedt, dan gaat dat ten koste van de intensiteit van het te onderzoeken licht. De methode volgens Vierordt met dubbele collimatorspleet (Engelmann) komt voor de successief-contrast-methode niet in aanmerking. Neutrale grijze glazen wiggen zijn bruikbaar, moeten evenwel geijkt worden en zijn niet altijd geheel neutraal.

Aan alle genoemde eisen voldoen bepaalde vormen van diaphragmata. Een diaphragma als lichtverzwakker dient zo te worden aangebracht, dat het alleen het licht verzwakt en niet wordt afgebeeld: bij een afbeeldend lenzensysteem dus in of nabij het optisch middelpunt. In dat geval is het diaphragmavlak gelijkmatig verlicht en de helderheid van een door deze lenzen ontworpen beeld evenredig met het oppervlak van de opening van het diaphragma. Daarbij behoort de opening van het lenzensysteem variabel te zijn bij constante apertuur van het lenzensysteem. Alleen in dat geval is de chromatische afwijking van het lenzenstelsel constant. Bovendien hebben Stiles en Crawford (geciteerd naar Kohlrausch ('35)) doen zien, dat de lichtindruk, die het oog ontvangt van een door een lenzenstelsel afgebeeld object, niet evenredig toeneemt met de opening van het diaphragma, indien daarbij de apertuur der lenzen verandert. De periphere stralen worden naar verhouding n.l. minder helder waargenomen dan de centrale. Een quadratisch diaphragma is dus minder geschikt, daar hier de periphere delen van het lenzensysteem alleen aan de afbeelding deelnemen als het diaphragma ver openstaat. Wel geschikt bleek bij onze experimenten te zijn een sectorendia-



phragma, dat bijv. kan bestaan uit drie vaste en drie losse sectoren van  $60^\circ$ , die ten opzichte van elkaar verspringen. De losse sectoren zijn met elkaar verbonden en draaibaar om de optische as van het lenzensysteem. Een schaalverdeling in graden geeft aan, welk gedeelte der lensopening bij elke stand van het stel losse sectoren vrijgelaten wordt. De apertuur van het systeem is hierbij constant en het oppervlak der opening is recht evenredig met de aflezing in graden, als  $0^\circ$  bij volkomen sluiting staat. Ter vermindering van fouten door buiging worden de waarden onder  $5^\circ$  niet gebruikt. Het meetbereik is dus 5 : 60. Was een groter bereik gewenst, dan werd deze uitbreiding bewerkt door variatie van de afstand van de lichtbron tot het door het lenzenstelsel afgebeelde reflecterende vlakje.

Thans rest ons nog de bespreking van de wijze, waarop het te onderzoeken licht en het standaardlicht aan de hier aangeduide spectrophotometrische combinatie behoort te worden toegevoerd.

In principe is het mogelijk het reële beeld, dat het microscopische objectief ontwerpt, direct op de collimatorspleet te projecteren. Deze oplossing brengt echter praktische bezwaren mede, daar in dat geval de gehele spectroscop voor het opzoeken van het gewenste deel in de coupe van het microscoop verwijderd zou moeten worden. Een nauwkeurige projectie van een klein object op de collimatorspleet is door de bewegingen bij het verstellen van de knoppen van de spectroscop op deze wijze bovendien nooit te bereiken. Beter is de volgende methode: spectrophotometer en microscoop worden niet onmiddellijk mechanisch verbonden, maar ieder voor zich op de tafel opgesteld. Een prisma, dat op eenvoudige wijze op het oculair kan worden bevestigd, ontwerpt via een aan de collimatorbuis gemonteerde lens op de collimatorspleet een beeld van een wijzer, die zich in het diaphragma van het oculair bevindt. Als men het prisma van het oculair afgenomen heeft, kan men op de normale wijze microscopiseren en het gewenste deel van het praeparaat voor de oculairwijzer brengen. Voor de meting behoeft men slechts het prisma op het oculair te bevestigen om dit deel van het praeparaat op de collimatorspleet te projecteren.

Het licht van de vergelijkingslichtbron is afkomstig van de gloeidraad van een nitralampje. Aangezien de chromatische afwijking van het afbeeldende lenzenstelsel door de geringe afmetingen van deze gloeidraad al te hinderlijk zou zijn, indien men de gloeidraad direct op de collimatorspleet zou afbeelden en bovendien de helderheid van het licht van dit lampje zeer aanzienlijk gereduceerd moet worden, wordt een effen wit vlakje, beschenen door de nitralamp, op de collimatorspleet geprojecteerd. Een blauw filter zorgt voor een betere aanpassing van het standaardlicht aan het fluorescentielicht; deze maatregel komt de nauwkeurigheid der metingen ten goede, daar hierdoor de verschillen in de indruk, die de niet-monochromatische delen van

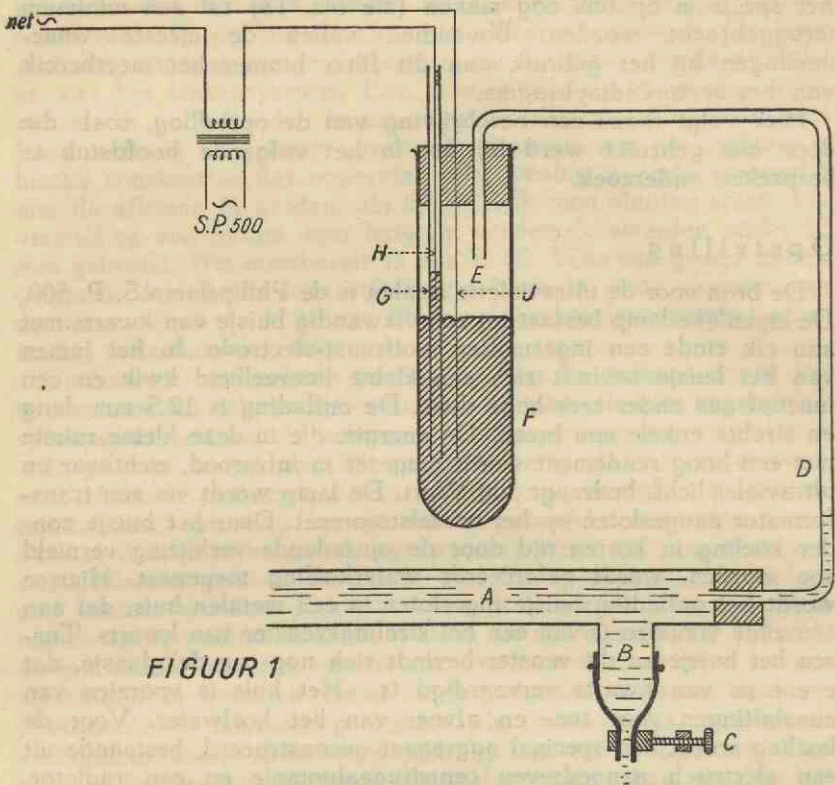
het spectrum op ons oog maken (zie blz. 18) tot een minimum teruggebracht worden. Bovendien vallen de meeste waarnemingen bij het gebruik van dit filter binnen het meetbereik van het sectorendiaphragma.

Hier volgt thans een beschrijving van de opstelling, zoals die door ons gebruikt werd bij het in het volgende hoofdstuk te bespreken onderzoek.

### Opstelling.

De bron voor de ultraviolette stralen is de Philipslamp S. P. 500. De eigenlijke lamp bestaat uit een dikwandig buisje van kwarts met aan elk einde een ingesmolten wolfram-electrode. In het lumen van het buisje bevindt zich een kleine hoeveelheid kwik en een inactief gas onder zeer hoge druk. De ontleding is 12,5 mm lang en slechts enkele mm breed. De energie, die in deze kleine ruimte met een hoog rendement wordt omgezet in infrarood, zichtbaar en ultraviolet licht, bedraagt 500 Watt. De lamp wordt via een transformator aangesloten op het wisselstroomnet. Daar het buisje zonder koeling in korten tijd door de optredende verhitting vernield zou worden, wordt geforceerde waterkoeling toegepast. Hiertoe wordt het ontledingsbuisje ingesloten in een metalen huis, dat aan één zijde voorzien is van een bol stralingsvenster van kwarts. Tussen het buisje en dit venster bevindt zich nog een dekglasje, dat eveneens van kwarts vervaardigd is. Het huis is voorzien van aansluitingen voor toe- en afvoer van het koelwater. Voor de koeling wordt een speciaal aggregaat geconstrueerd, bestaande uit een electrisch aangedreven centrifugaalpompje en een radiator, doch aansluiting van de koeling op de waterleiding is onder bepaalde omstandigheden ook mogelijk. Het leidingwater dient daartoe een hoge graad van zuiverheid te bezitten, daar zich anders op het warme kwartsbuisje een neerslag vormt, dat het rendement en de levensduur van de lamp ongunstig beïnvloedt. Daar elke stagnatie in de koeling de in bedrijf zijnde lamp grote schade doet, behoort ook bij koeling door middel van de waterleiding in de primaire stroomketen van de transformator der lamp een schakelaar te worden opgenomen, die de stroom verbreekt, zodra er iets aan de koeling hapert. Deze schakelaar hebben wij in onze opstelling als volgt ingericht: uit het einde van de afvoerleiding A (fig. 1) kan het koelwater door een zijbuis B, welks lumen door de klemkraan C regelbaar is, afstromen. Door de locale weerstand bij C stijgt de druk in A en het water dringt het buisje D binnen, de lucht hierin en in de reageerbuis E boven het kwikniveau comprimerend. Onder invloed van deze drukverhoging stijgt het kwik F in de stijgbuis G omhoog en bereikt de electrode H. Steeds in het kwik gedompeld is de electrode I en de beide genoemde electroden zijn zo verbonden met het lichtnet en de transformator van de S. P. 500, dat de primaire stroom doorgaat, zolang het kwik de electrode H





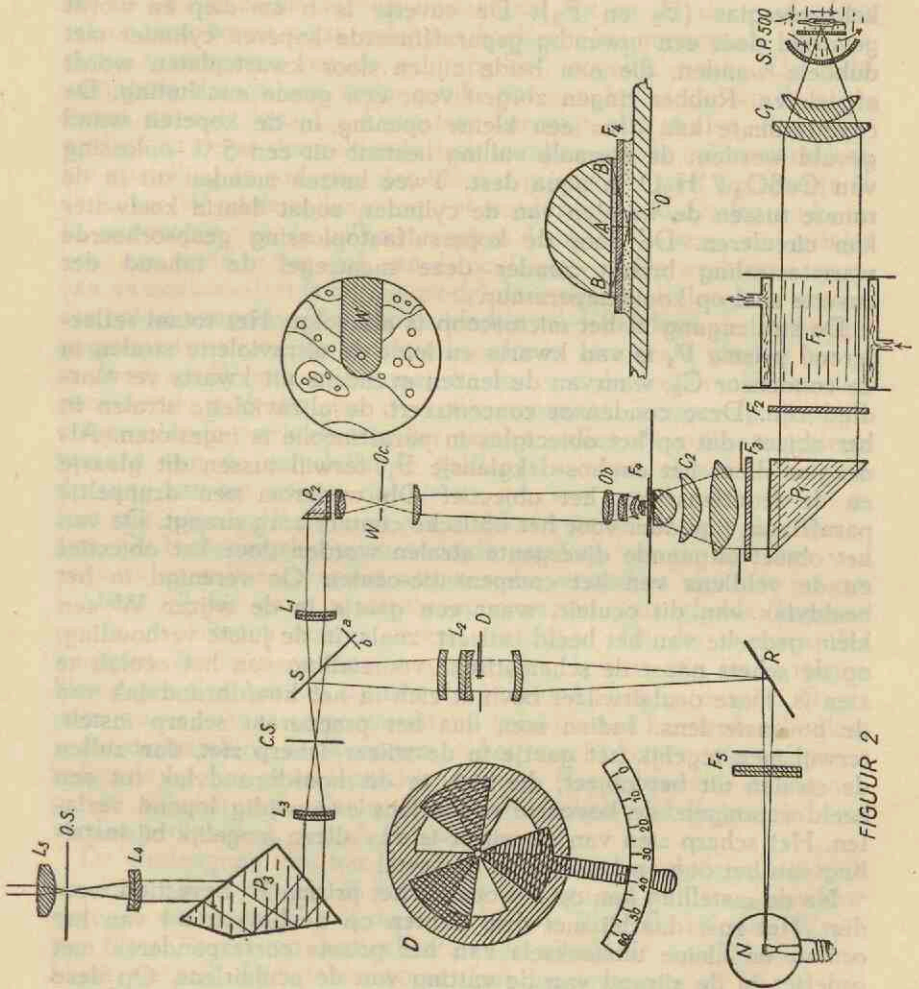
FIGUUR 1

bereikt. Elke vermindering in de doorstroming van de koelmantel van de lamp uit zich in een afname van de druk in A en zal, indien zij groot genoeg is, aanleiding geven tot de verbreking van het contact tussen het kwik en de electrode H. De weerstand C wordt zo ingesteld, dat dit contact eerst tot stand komt, als een ruim overschot boven het voor de koeling van de lamp benodigde minuten-volume door de koelmantel stroomt.

De gemiddelde levensduur van de S. P. 500 wordt opgegeven als 200 uur; zij is zeer sterk afhankelijk van het aantal malen, dat de lamp aan- en uitgeschakeld wordt, zodat enkele lange perioden van constant gebruik oeconomischer zijn dan vele korte. (Onze eerste lamp brandde bij een gemiddelde gebruiksduur van  $2\frac{1}{2}$  uur in totaal ongeveer 150 uren. Van een neerslag op de buitenzijde van het kwartsbuisje was geen spoor te bekennen; blijkbaar leent het Utrechtse leidingwater zich voortreffelijk voor de koeling.)

Deze lamp werd opgesteld op de plaats van de lichtboog in een Reichert-Haitinger'se ultravioletstraler, de Reichert Kam F. Dit is een metalen huis, dat aan één zijde voorzien is van een cilindrische uitbouw, waarin een tweelenzige kwartscollector verstelbaar is aangebracht. (fig. 2, C<sub>1</sub>). Bij de originele constructie vond ook de





FIGUR 2

kopersulfaatcuvette een plaats in deze uitbouw, doch daar deze cuvette voor het gebruik bij de S. P. 500 te ondiep was, werd zij vervangen door een veel diepere, die toen evenwel tussen het lamphuis en het microscoop moest worden opgesteld.

Het filter, dat uit de straling der kwiklamp de ultraviolette stralen afzondert, bestaat uit deze cuvette ( $F_1$ ) en uit twee lagen nikkeloxyde-glas ( $F_2$  en  $F_3$ ). De cuvette is 6 cm diep en wordt gevormd door een inwendig geparaffineerde koperen cylinder met dubbele wanden, die aan beide zijden door kwartsplaten wordt afgesloten. Rubber ringen zorgen voor een goede aansluiting. De cuvetteruimte kan door een kleine opening in de koperen wand gevuld worden; de normale vulling bestaat uit een 5 % oplossing van  $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  in aqua dest. Twee buizen monden uit in de ruimte tussen de wanden van de cylinder, zodat daarin koelwater kan circuleren. De door de kopersulfaatoplossing geabsorbeerde warmtestraling brengt zonder deze maatregel de inhoud der cuvette snel op kooktemperatuur.

De stralengang in het microscoop is als volgt: Het totaal reflecterend prisma  $P_1$  is van kwarts en leidt de ultraviolette stralen in de condensor  $C_2$ , waarvan de lenzen eveneens uit kwarts vervaardigd zijn. Deze condensor concentreert de ultraviolette stralen in het object, dat op het objectglas in paraffineolie is ingesloten. Als dekglas dient het euphos-dekglasje  $F_4$ , terwijl tussen dit glasje en de frontlens van het objectief  $Ob$  wederom een druppeltje paraffinum liquidum voor het optische contact zorg draagt. De van het object uitgaande divergente stralen worden door het objectief en de veldlens van het compensatie-oculair  $Oc$  verenigd in het beeldvlak van dit oculair, waar een gaatje in de wijzer  $W$  een klein gedeelte van het beeld isoleert, zoals, in de juiste verhouding, op de schets naast de schematische voorstelling van het oculair te zien is. Deze oculairwijzer bevindt zich in het hoofdbrandvlak van de bovenste lens. Indien men dus het praeparaat scherp instelt, terwijl men tegelijk het gaatje in de wijzer scherp ziet, dan zullen de stralen uit het object, die zich in dit hoofdbrandvlak tot een beeld verenigen, de bovenste oculairlens evenwijdig lopend verlaten. Het scherp zien van de wijzer is dus alleen mogelijk bij instelling van het oog op het zien in de verte.

Na de instelling kan op het oculair het prisma  $P_2$  bevestigd worden. Het rust daarbij met drie punten op de bovenrand van het oculair en kleine uitsteeksels van het prisma corresponderen met groefjes in de zijrand van de vating van de oculairlens. Op deze wijze kan het prisma telkens in volmaakt gelijke stand op het, in de microscopetubus vastgezette, oculair bevestigd worden.

De in het volgende hoofdstuk vermelde metingen werden uitgevoerd met een Leitz 1/12 olie-immersie (n.a.: 1.30) en een Zeiss compensatie-oculair van  $5 \times$ . Zoals reeds werd opgemerkt, kan men door verandering in de toegepaste vergroting wijziging bren-



gen in de grootte van de partikeltjes, waaraan metingen nog mogelijk zijn.

Als spectroscop wordt de kleine monochromator van Leitz gebruikt. Dit instrument is uitgerust met een rechthoekig afbuigend prisma  $P_3$  en met verstelbare oculair- en collimatorspleten (O. S. en C. S.). De spectroscop is stevig aan een statief bevestigd, zo, dat de as der collimatorbuis horizontaal ligt en die der oculairbuis schuin naar boven wijst onder een hoek met het horizontale vlak, die rustig waarnemen van de oculairspleet mogelijk maakt. De collimatorbuis draagt een verlengstuk, dat aan het einde wordt afgesloten door de lens  $L_1$ . Deze lens verenigt alle stralen, die evenwijdig aan de as der collimatorbuis invallen, op de collimatorspleet. De opstelling is zodanig, dat via het prisma  $P_2$  juist het gaatje in de wijzer  $W$  op de collimatorspleet wordt afgebeeld. De lenzen  $L_3$  en  $L_4$  ontwerpen van de collimatorspleet door het dispergerend prisma heen een beeld in het vlak van de oculairspleet. De werkzame lengte van de oculairspleet is bij ons model door twee dicht langs de sneden der spleet aangebrachte reepjes bladtin zoveel verkort, dat de hoogte ongeveer twee maal de grootste breedte is. Het beeld van het gaatje in de wijzer  $W$  valt op het met dit deel van de oculairspleet corresponderende gedeelte van de collimatorspleet. Tengevolge van de dispergerende werking van het prisma vallen de collimatorspleetbeelden van de verschillende golflengten naast elkaar; door verdraaiing van het prisma, dat hiertoe van een instelknop is voorzien, kan men elke golflengte in het midden van de oculairspleet brengen. De bedieningsknoppen voor de regeling van de breedten van oculair- en collimatorspleet en voor de verstelling van het prisma hebben wij bij onze spectroscop voorzien van gladde koperen ringen, waartegen nokjes verend drukken. Bij die standen der knoppen, die bij de meting in aanmerking komen, zijn in de ringen kleine groefjes gevijld, waarin de genoemde nokjes passen. Daardoor wordt telkens enige weerstand geboden aan het verder draaien, zodat de instelling der knoppen bij het in acht nemen van een vaste volgorde op het gevoel geschiedt kan. Het tijdrovende en inspannende aflezen van slecht bereikbare schaalverdelingen in een verduisterd vertrek vervalt hierdoor.

De stralengang van het licht van de standaardlichtbron blijkt uit het linker deel van fig. 2. Het licht van een via een transformator gevoede nitralamp  $N$  valt door het blauwe filter  $F_5$  (Kodak Wratten filter 78 A) op het reflecterende vlakje  $R$  (plakkaatwit op blank metaal). Dit vlakje wordt door het lenzenstelsel  $L_2$  via het spiegelte  $S$  afgebeeld op de collimatorspleet. Tussen de lenzen van  $L_2$  bevindt zich, dicht bij het optisch middelpunt, het sectorendiafragma  $D$ , dat terzijde van de stralengang nog eens, van boven gezien, wordt weergegeven. De opening, die de sectoren vrijlaten, is van buitenaf te variëren en in graden afleesbaar. Het spiegelte  $S$  bevindt zich in de collimatorbuis tussen de collimatorspleet en de lens  $L_1$ . Het kan door middel van een photographische draad-



ontspanner om de as  $a-b$  weggeklapt worden en laat dan het licht, dat door de lens  $L_1$  valt, door. Staat het spiegelte ingeklapt, zoals in de tekening, dan wordt deze stralengang onderbroken en het licht uit  $L_2$  op de collimatorspleet geleid.

De gehele opstelling is afgeschermd, zodat noch het zichtbare licht van de S. P. 500, noch dat van de standaardlamp in het vertrek schijnen kan. Alleen onder die omstandigheden is de voor de metingen vereiste graad van adaptatie te bereiken en te behouden. De aflezingen van het sectorendiaphragma geschieden bij het licht van een hiertoe ontstoken donkerrode lamp, daar dit licht de adaptatie niet schaadt.

### M e t i n g.

Met deze opstelling wordt aldus gemeten: als de onderzoeker aan het donker geadapteerd is, worden de S. P. 500 en de standaardlamp ontstoken. Het te onderzoeken deel van de coupe brengt men met behulp van de kruistafel onder het gaatje in de oculairwijzer  $W$ , daarna bevestigt men het prisma  $P_2$  op het oculair en begint met de eigenlijke meting. Hiertoe wordt het prisma  $P_3$  van de spectroscop zó gesteld, dat de golflengte  $450 \text{ m}\mu$  juist in het midden van de oculairspleet valt en de breedte van deze spleet wordt gelijk gemaakt aan die van het collimatorspleetbeeld en wel zo breed, als de lijnen 440 en  $460 \text{ m}\mu$  uiteenliggen. De standen, die de knoppen hiertoe moeten innemen, zijn eens en vooral bepaald en vastgelegd door de plaatsing van de groefjes in de ringen om de knoppen. Het instellen is op deze manier het werk van een ogenblik. Terwijl het oog door de loupe  $L_5$  de oculairspleet waarneemt, kan men door het spiegelte  $S$  te bewegen afwisselend het licht uit de onderzochte coupe en dat uit de standaardlichtbron bezien. Door verstelling van het sectorendiaphragma vindt men de stand, waarbij deze lichtsoorten gelijk van intensiteit zijn. Deze stand wordt afgelezen en genoteerd. (Het is mogelijk om voor de registratie van deze waarden een methode te vinden, die dit aflezen overbodig maakt, doch de ervaringen met een dergelijke inrichting leerden al spoedig, dat ons oog reeds na de waarneming van enkele wisselingen minder gevoelig wordt voor intensiteitsverschillen en dat de gevoeligheid gedurende de korte pauze, die nodig is voor de aflezing en het noteren van de diaphragmawaarden, zich juist herstelt.) Is de eerste waarde vastgelegd, dan zet men het prisma op  $470 \text{ m}\mu$ , regelt oculair- en collimatorspleetbreedten bij en vergelijkt weer de intensiteiten. Zo gaat men verder, zo ver als de lichtsterkte en het spectrum dat toelaten. De directe metingsuitkomsten zijn dus aflezingen van de gradenverdeling van het diaphragma, geordend naar de golflengten. Aangezien de helderheid van het door dit diaphragma doorgelaten licht recht evenredig is met de opening in graden, kan men deze metingsuitkomsten direct verwer-



ken als  $\alpha$ ,  $\beta$ , enz. in de formule (2) op blz. 20. Voor de bepaling van de factoren  $(i_a \cdot x_a)$ ,  $(i_b \cdot x_b)$ , enz. in deze formule moet echter aan een meting een ijking voorafgaan.

### Ijking.

De ijking van een opstelling komt in het algemeen hierop neer, dat men aan de hand van een meting aan een *bekend object* nagaat, welke de apparaatconstanten zijn, die moeten worden ingevoerd bij de berekening van de uitkomsten van een meting aan een *onbekend object*. Voorwaarde voor een ijking is, dat de meting aan het bekende object onder gelijke omstandigheden geschiedt als die aan het onbekende. Hierbij stuit men in het onderhavige geval op grote moeilijkheden. Practisch bruikbare „bekende objecten” zijn gloeidraden van gloeilampen. De gemiddelde temperatuur van deze draden (en daarmee de spectrale intensiteitsverdeling van het door deze draden uitgezonden licht) is door de constructie en door het gebruik bij de voorgeschreven spanning vastgelegd en voor de verschillende typen van gloeilampen bekend (Danckwortt). Deze gloeidraden zijn evenwel niet op die plaats aan te wenden, waar de te meten fluorescentieverschijnselen ontstaan, t.w. tussen euphos- en objectglas. Het licht van de gloeidraad moet dus met behulp van lenzen geconcentreerd worden op deze plaats en van daar uit het objectief op dezelfde wijze en in dezelfde verdeling over de apertuur als het fluorescentielicht bereiken. In fig. 2 is de frontlens terzijde nog eens, vergroot, weergegeven. Eronder ziet men het object  $O$  en tussen beide  $F_1$ , het euphosfilter. Het is duidelijk, dat in deze figuur de straal  $OA$  een kortere weg aflegt door het euphosglas dan de straal  $OB$ . Daar het euphosglas ook het zichtbare licht verandert, zal  $OA$  in het verdere verloop anders verzwakt zijn dan  $OB$ . Het onderzochte licht is een mengsel van de stralen  $OA$ ,  $OB$  en alle overgangen hiertussen, zodat streng genomen de spectrale samenstelling van dit menglicht dus afhankelijk is van de verhoudingen, waarin deze categorieën vertegenwoordigd zijn in het licht, dat door het objectief valt. Het licht van de ijklamp zal in dezelfde verhouding aan het objectief aangeboden moeten worden. Nu is over de verdeling van het licht uit fluorescerende deeltjes weinig bekend, daar de factoren, die hierop van invloed zijn, zoals de vorm van de deeltjes en de eigen absorptie van het fluorescentielicht, in microscopische praeparaten niet bekend zijn. Derhalve worden bij de ijking enige benaderingen ingevoerd: het licht van een gloeidraadlamp, dat door een condensor, voorzien van een matglasje, op het object  $O$  geconcentreerd wordt, is in spectrale samenstelling gelijk aan dat van de gloeidraad, die het matglasje beschijnt en treedt door 't euphosglas in het objectief met eenzelfde verhouding tussen centrale en perifere stralen als het fluorescentielicht. De overeenkomst tussen de metingsresultaten

bij het gebruik van objectieven van verschillende aperturen en van ijklampen van verschillende „kleurtemperaturen” leert, dat deze benaderingen bij de bestaande proeffout geoorloofd zijn. Ook de chromatische afwijking van het gebruikte immersieobjectief blijkt, bij de afmetingen van onze objecten, de metingsresultaten niet merkbaar te beïnvloeden.

De verwerking van de bij de ijking verkregen aflezingen geschiedt aan de hand van de formule:

$$(i_a \cdot x_a) = \frac{I_a}{\alpha \cdot C}, \quad (i_b \cdot x_b) = \frac{I_b}{\beta \cdot C} \text{ enz.} \quad (3)$$

waarin  $I_a$  de relatieve intensiteit is van de ijklamp voor de golflengte  $a$ , in een willekeurige maat uitgedrukt (in procenten van de intensiteit bij  $560 \text{ m}\mu$  bijv.) en  $\alpha$  de aflezing bij de golflengte  $a$ . De factor  $C$  wordt niet bepaald, daar het slechts gaat om relatieve en niet om absolute intensiteitswaarden. Men kiest voor  $C$  een waarde, waarvoor de producten  $(i_a \cdot x_a)$ ,  $(i_b \cdot x_b)$ , enz. praktisch bruikbare getallen worden. Zoals men ziet, wordt slechts het product  $(i \cdot x)$  bepaald en niet  $i$  en  $x$  ieder apart. In de praktijk is de kennis van dit product voldoende, zoals blijkt uit de formule (2) op blz. 20. Bij onze opstelling was de spectrale samenstelling van het licht van de standaardlamp zelf dan ook niet bekend, daar deze lamp op een geringere spanning brandde dan ervoor werd voorgeschreven. Dit kwam de levensduur der lamp ten goede en bovendien was de aanpassing van de ijkcurve aan het in weefselcoupes overheersende blauwe fluorescentielicht bij deze spanning beter.

Tot de ijking behoort ook de geregelde controle op de juistheid der instelling van de groefjes op de bedieningsknoppen. De prisma-instelling wordt gecontroleerd bij nauwe collimator- en oculairspleet aan de hand van het lijnenspectrum van een kwiklamp. Op grond van hetzelfde lijnenspectrum hebben wij een schaal vervaardigd, die aangeeft, op welke afstand in elk spectraalgebied golflengten, die  $20 \text{ m}\mu$  verschillen, van elkaar verwijderd liggen. Deze schaal is de grondslag voor de controle op de breedten van oculair- en collimatorspleet bij elk in aanmerking komend spectrumdeel. Dat het hierbij niet om kleine verschillen gaat, blijkt uit het feit, dat de spleetbreedten bij  $450 \text{ m}\mu$  ruim 2,5 maal zo groot kunnen zijn als bij  $600 \text{ m}\mu$ . Hieruit blijkt wel duidelijk, welke winst aan lichtsterkte wij in het blauwe deel van het spectrum konden behalen, zonder dat de nauwkeurigheid geringer werd dan die, welke in het gebied van  $600 \text{ m}\mu$  mogelijk was.

Tenslotte moet van tijd tot tijd worden nagegaan, of het gaatje in de wijzer van het oculair nog wel juist op de collimatorspleet geprojecteerd wordt. Hiertoe worden oculair- en collimatorspleet



wijd opengezet en het totaal reflecterende kwartsprisma onder de microscoopcondensor vervangen door een electrisch natriumlampje. Staat de spectroscop op de golflengte der natriumlijnen ingesteld, dan kan men bij dit monochromatische licht door de spectroscop heen het gaatje afgebeeld zien op de collimator-spleet en eventuele ontregelingen nauwkeurig herstellen.

### Verwerking der uitkomsten.

De verhoudingen  $I_a : I_b$  enz. van de ijklamp zijn energieverhoudingen en zo geven dus ook de metingsuitkomsten energieverhoudingen aan. Men kan deze verhoudingen weergeven in een ordinatenstelsel, waarin op het horizontale been de golflengten zijn afgezet en op het verticale een willekeurige verdeling is aangebracht. Men vermenigvuldigt alle uitkomsten van een meting met een dusdanige, voor alle golflengten gelijke, factor, dat de curven op overzichtelijke wijze ten opzichte van dit ordinatenstelsel en ten opzichte van elkaar getekend kunnen worden. Daarbij worden de waarden uitgezet bij de golflengten, die bij de bepaling maximaal in de gemeten spectrumdelen vertegenwoordigd waren.

Bayle, Fabre en George ('25) vermenigvuldigden de getallen, die de energieverhoudingen aangaven, nog met de bij de golflengten behorende helderheidscoëfficiënten van ons oog en kregen zo een curve van relatieve helderheidsverdeling. Hetzelfde doet, in hun voetspoor, Policard. Inderdaad is de kleur van het onderzochte licht hierdoor gekarakteriseerd, doch het gaat bij dit onderzoek niet zozeer om de kleur van het licht als wel om een identificatie of een typering van de stof, die het licht uitzendt. Hiervoor nu is de curve van spectrale energieverdeling even bruikbaar als die van de spectrale helderheidsverdeling en om de eenvoudiger afleiding te verkiezen. Nog afgezien van het feit, dat de gebruikte helderheidscoëfficiënten slechts gelden voor een gemiddelden waarnemer bij een bepaalde adaptatietoestand en dus slechts van betrekkelijke waarde zijn. Slechts in die gevallen, waar het gaat om een juiste definitie van de kleur van het licht, zoals bij onderzoekingen over de physiologie van het zien, of bij proeven op het terrein van de verlichtingstechniek, is een dergelijke herleiding van de curve van spectrale intensiteitsverdeling gerechtvaardigd.

Aan de hand van een getallenvoorbeeld zullen wij de berekeningen, die bij de ijking en de meting uitgevoerd moeten worden, illustreren:

Stel, dat de gemiddelde uitkomsten bij een ijking bedragen:

450 m $\mu$ : 22°,  
 470 m $\mu$ : 33°,  
 490 m $\mu$ : 50,5° enz.,

dan deelt men door deze waarden ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  enz. uit de formule (3)) de relatieve intensiteitswaarden van de ijkclamp (2400° C), (in procenten van de intensiteit bij 560  $m\mu$ ):

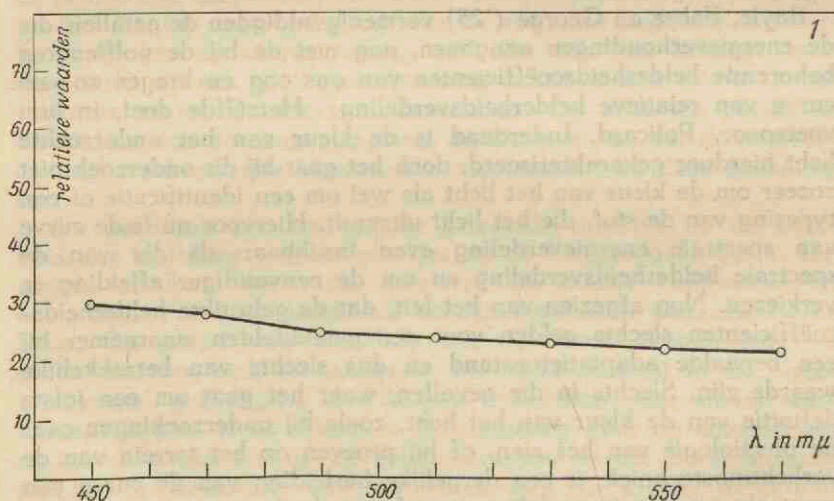
450  $m\mu$ : 22,  
470  $m\mu$ : 31,  
490  $m\mu$ : 42 enz.,

(de waarden van  $I_a$ ,  $I_b$ ,  $I_c$  enz. in de formule (3)). De uitkomsten dezer delingen zijn:

450  $m\mu$ : 1,  
470  $m\mu$ : 0,93,  
490  $m\mu$ : 0,83 enz.

Deze waarden zijn niet praktisch in curven uit te zetten, daarom kiezen wij voor de factor C de waarde 0,033, vermenigvuldigen dus de bovenstaande getallen met 30 en krijgen als bruikbare waarden voor onze ijkcurve:

450  $m\mu$ : 30,  
470  $m\mu$ : 28,  
490  $m\mu$ : 25 enz. (zie grafiek 1).



Grafiek 1.

Ijkcurve.

(Collimatorspleet en oculairspleet overeenkomend met 20  $m\mu$  dispersie).

Dit zijn dus de relatieve waarden van de producten ( $i_a \cdot x_a$ ), ( $i_b \cdot x_b$ ) enz.

Bij de berekening van de uitkomsten van een meting is het proces juist omgekeerd, zoals blijkt uit de formule (2) op blz. 20.



Hier worden de aflezingen in graden vermenigvuldigd met de waarden van de bovengenoemde producten ( $i_a \cdot x_a$ ), ( $i_b \cdot x_b$ ) enz., en met een geschikte factor, zodat de curven overzichtelijk ten opzichte van elkaar getekend kunnen worden. Waren dus de aflezingen:

450 m $\mu$ : 9°,  
 470 m $\mu$ : 11°,  
 490 m $\mu$ : 10° enz.,

dan zijn de intensiteitswaarden in het fluorescentielicht:

450 m $\mu$ : 9.30. C = 270. C,  
 470 m $\mu$ : 11.28. C = 308. C,  
 490 m $\mu$ : 10.25. C = 250. C enz.;

daar reeds bij de ijking C niet bepaald werd en een willekeurige waarde kreeg, kunnen geen absolute intensiteiten worden opgegeven, in eenheden als erg/sec. cm<sup>2</sup>. Derhalve worden de bovengenoemde waarden door de keuze van C = 0,1 herleid tot de practisch bruikbare verhoudingsgetallen:

450 m $\mu$ : 27,  
 470 m $\mu$ : 31,  
 490 m $\mu$ : 25 enz.,

welke getallen bij het tekenen van de grafieken worden gebruikt.

Uit de berekening van de uitkomsten van de metingen bleek, dat bij elke berekening de aflezingen in graden vermenigvuldigd moeten worden met de bijbehorende producten ( $i_a \cdot x_a$ ), ( $i_b \cdot x_b$ ), enz., welke producten bij de ijking bepaald werden. Aangezien de waarden van deze producten bij de verschillende ijkingen tamelijk constant werden gevonden, loonde het de moeite tabellen te vervaardigen, waarin de vermenigvuldigingen van deze producten met elk der mogelijke aflezingen in graden van 5° tot 60° eens en voor al waren uitgevoerd en vastgelegd. Na een meting behoefden wij dus slechts de uitkomsten dier vermenigvuldigingen in de tabellen op te zoeken, hetgeen een belangrijke tijdsbesparing betekende. Wij hadden deze tabellen aangelegd voor alle waarden der producten tussen 35 en 18, zodat wij in het geval, dat de ijkcurve wat anders uitviel, slechts door een gelukkige keuze van de factor C zorgden, dat de waarden der producten ( $i_a \cdot x_a$ ), ( $i_b \cdot x_b$ ), enz. zich binnen deze grenzen bewogen, om voor elke golflengte over een dergelijke rekentabel te beschikken. In het geval van de ijkcurve op grafiek 1 waren dus slechts de tabellen voor de waarden 30, 28, 25, 24, 23, en 22 nodig; bij andere uitkomsten van de ijking hadden wij bijvoorbeeld die voor de waarden 27 en 21 bovendien van node.

## Meetbereik, gevoeligheid en nauwkeurigheid.

Het meetbereik is afhankelijk van de intensiteit en het spectrum van het te onderzoeken licht. Bij onderzoek aan de eigen fluorescentie van celbestanddelen in dunne coupes zijn metingen mogelijk van 450 tot 570 of 590  $m\mu$ , al naar de kleur van het licht. De sterkte van het fluorescentielicht van dergelijke, niet met fluorochromen behandelde coupes was nog juist zo groot, dat met de methode metingen mogelijk waren; absolute metingen over de lichsterkten, die met onze methode nog meetbaar zijn, werden niet verricht. De kleinste afmetingen van de vlakjes, welker fluorescentie in coupes van 5  $\mu$  dikte bij onze optiek gemeten konden worden, bedroegen ongeveer 5  $\mu$  in het vierkant. De nauwkeurigheid, waarmee de metingen gereproduceerd konden worden, was aan de uiteinden van het meetbereik geringer dan in het midden, gemiddeld bedroeg de afwijking evenwel niet meer dan 5 %.

De hiervoor beschreven opstelling is niet in korte tijd ontstaan; eerst gedurende vele proefnemingen bleek het belang van de, in de inleiding tot dit hoofdstuk genoemde, factoren voor het welslagen der metingen. Bovendien moesten talrijke vraagstukken van gering principieel, doch van groot practisch belang, opgelost worden. De grootste moeilijkheden betroffen de wisseling van het licht voor de verkrijging van het successieve contrast, de ultraviolet-filters, de standaardlichtbron en de plaatsing van 't euphos-filter.

Vermeulen en Hagedoorn geven een wisselmechanisme aan, waarbij de afwisseling tussen te meten licht en standaardlicht geheel automatisch en regelmatig geschiedt. Een hoorbaar signaal diende daarbij als waarschuwing voor den onderzoeker, dat de overgang van de ene lichtsoort op de andere geschiedde. Dit systeem beviel ons niet, daar het bleek, dat het voor een meting niet noodzakelijk was, dat de beide lichtsoorten evenlang werden waargenomen en dat metingen bij de allergeeringste intensiteiten een grotere tussenpoos tussen de wisselingen eisten dan die bij iets grotere helderheden. Bovendien hield het hoorbare signaal voor ons een element van verrassing in zich, dat de uitkomsten der metingen nadelig beïnvloedde. In verband hiermede kozen wij het beschreven wisselmechanisme, dat deze nadelen niet vertoont: men heeft het tempo der wisselingen geheel in de hand en kent volkomen zeker het moment van de overgang van de ene lichtsoort op de andere. Op een mogelijkheid, om de invloed van de ultraviolette stralen op het object tot een minimum te beperken bij het gebruik van de successief-contrast-methode, moet in dit verband nog gewezen worden: in gevallen, waar de inwerking van de ultraviolette straling op het praeparaat de metingen onmogelijk maakt, kan men aan het lichtwisselmechanisme mechanisch of electricisch een onderbreker voor de ultraviolette straling koppelen, zodat deze straling slechts gedurende de tijd, dat het



fluorescentielicht door het metende oog gepercipieerd wordt, tot het praeparaat wordt toegelaten. Op deze wijze kan de schadelijke invloed van dit ultraviolette licht zeer belangrijk beperkt worden, zoals in een dergelijke, door ons gebruikte, opstelling bleek.

Uit een streven om een voor meerdere golflengten bruikbaar „universeel” filter toe te passen, vloeiden experimenten voort met een „Christiansen-filter voor ultraviolet licht”. Christiansen-filters zijn in het algemeen cuvetten, waarin een vaste stof in poedervorm en een vloeistof, gemengd, voorkomen. De stoffen worden zó gekozen, dat zij bij een bepaalde temperatuur slechts voor één golflengte een gelijke brekingsindex hebben. Slechts voor die golflengte is het filter transparant, terwijl het de stralen van andere golflengten verstrooit en slechts zeer verzwakt doorlaat. Men kan door variatie van de temperatuur van het filter invloed uitoefenen op de brekingsindices der gebruikte vulmiddelen en daarmee op de golflengte, welke maximaal wordt doorgelaten. Een dergelijk filter, dat bruikbaar is in het nabije ultraviolet en dat door v. Fragstein ('33) werd ontworpen, hebben wij beproefd. Het bleek evenwel, dat het bij dit filter noodzakelijk was het licht van onze kwiklamp van te voren door een nikkeloxyde-glas te zeven, daar het de zichtbare stralen van deze lamp in te grote intensiteit doorlaat. Daarmede verviel evenwel het voordeel van de universele bruikbaarheid, daar de transmissie-curve van het nikkeloxyde-glas, die een sterke top bij  $360\text{ m}\mu$ , vertoont, dit glas niet tot een ideaal vóórfilter stempelt voor gebruik bij  $334$  of  $313\text{ m}\mu$ , daar deze golflengten dus slechts zeer verzwakt doorgelaten worden. Hetzelfde bezwaar geldt het door mij beproefde Bäckström-filter. Dit filter bestaat uit een mengsel van oplossingen van nikkel- en cobaltsulfaat. Het laat ultraviolet licht van kortere golflengte dan  $334\text{ m}\mu$  door. Bovendien evenwel enig geel licht en dit is bij ons onderzoek zeer storend. Weliswaar kan men de laagdikte van het filter veel groter nemen dan in het originele voorschrift staat, bovendien het filter combineren met één laag nikkeloxyde-glas, doch dan wordt de intensiteit van het doorgelaten licht zó gering, dat metingen aan de er door opgewekte fluorescentie niet mogelijk zijn. Tenslotte trachtte ik met een vloeistoffilter volgens de voorschriften van Kubowitz en Haas ('32) de violette kwiklijnen te isoleren. Ook hierbij was de intensiteit van het geïsoleerde licht te gering voor metingen aan de eigen fluorescentie van cellen.

De grootste moeilijkheden bij de keuze der standaardlichtbron vloeiden voort uit een overschatting van de invloed, die de wisselingen in de spanning van het stadsnet zouden hebben op de helderheid van de ultraviolette lichtbron (en daarmee op de helderheid van het fluorescentielicht) en van de standaardlamp. Het lag voor de hand een standaardlichtbron te kiezen, waarvan de helderheid gelijkmatig met die van het te meten fluorescentie-



licht zou variëren, dus een door dezelfde ultraviolette lichtbron beschenen fluorescerende standaard. In de practijk is het evenwel moeilijk een fluorescerende standaard te vinden, die een geschikt emissiespectrum paart aan een absolute ongevoeligheid voor de ultraviolette bestraling. Onze proeven met mengsels van oplossingen van fluorescerende stoffen leverden in dit opzicht evenmin iets bruikbaar als experimenten met aan krijt geadsorbeerde minerale olie. Het uraanglas, dat als standaard voor dergelijke doeleinden wel gebruikt is, vertoont in de spectrale curve een stompe top bij 520 tot 540  $m\mu$ , met naar beide zijden zeer snel afnemende intensiteiten en is dus, gezien de overweging op blz. 18, al zeer weinig geschikt als vergelijkingsobject voor metingen van 450 tot 590  $m\mu$ . Bovendien verandert de fluorescentiekleur van uraanglas zich volgens Danckwortt reeds bij geringe verwarming. Ook Na-salicylaat leent zich op grond van het fluorescentiespectrum niet voor het gebruik als standaard, daar onze metingen een zeer steil verloop van het blauw naar het rood in de spectrale curven lieten zien, ook nog niet, als het licht door een geelfilter gemodificeerd wordt. Op grond van deze ervaringen kozen wij tenslotte de aangegeven combinatie van nitralamp, filter en reflecterend vlakje, die, zoals de vergelijking van de ijkcurve (grafiek 1) met de curven der blauwe celfluorescentie (grafieken 3 tot 8) in het volgende hoofdstuk doet zien, een ideale aanpassing van het standaardlicht aan het gemeten licht levert. In de practijk blijkt een hinderlijke invloed van de netschommelingen op de metingen niet te bestaan; deze invloed blijft beneden de foutengrens der methode.

Op blz. 29 wordt gesproken over het gebruik van het euphosfilter op een plaats, waar de stralen zeer sterk divergent zijn en alle dus trajecten van verschillende lengte in het euphosglas afleggen en over de consequenties hiervan voor de ijking. Bij vele van de vroegere metingen werd het filter dan ook aangewend op een plaats, waar de doorvallende stralen ongeveer parallel lopen, t.w. vlak boven het objectief. Toen evenwel metingen aan dunnere coupes noodzakelijk werden, bleek de eigen fluorescentie van het — bij deze opstelling niet tegen de ultraviolette stralen beschermde — objectief zo hinderlijk te zijn, dat de nauwkeurigheid der metingen belangrijk verminderde, zodat het euphosglas weer als dekglas in gebruik moest komen.

Zo ontstond gaandeweg de in dit hoofdstuk beschreven apparatuur. Natuurlijk werden er reeds metingen verricht, voordat de methode tot de huidige vorm ontwikkeld was; over de resultaten van deze metingen zal in hoofdstuk VI nog een en ander medegedeeld worden, over de metingen, die gedaan werden met de hierboven beschreven opstelling, bericht hoofdstuk V.

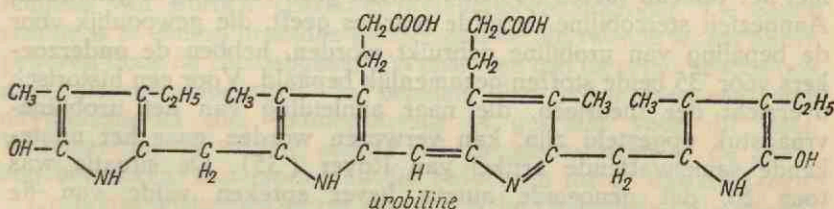


## V. HISTOLOGISCH UROBILINE ONDERZOEK.

### Inleiding.

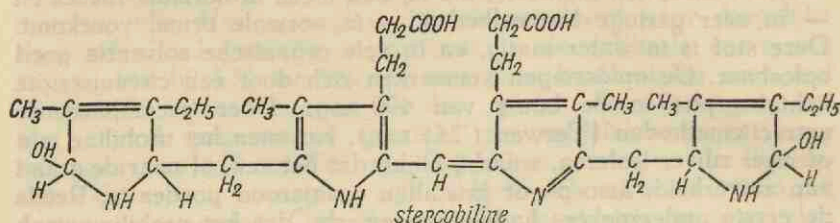
Urobiline is een kleurstof, die bij den mens in normale faeces en — in zeer geringe hoeveelheden — in normale urine, voorkomt. Deze stof is in water matig, en in vele organische solventia goed oplosbaar. De oplossingen kenmerken zich door een circumscrippte lichtabsorptie in de buurt van 490 m $\mu$ . Door gecompliceerde extractiemethoden (Terwen ('24) e.a.), kan men het urobiline min of meer zuiver isoleren, waarbij blijkt, dat het een, al naar de graad van zuiverheid, amorph of kristallijn oranje-rood poeder is. Reeds de eerste onderzoekers hadden opgemerkt, dat het urobiline vaak niet als zodanig in faeces of urine aanwezig was, maar als een kleurloos voorstadium, als een chromogeen: het urobilinogeen. Deze stof gaat licht door oxydatie over in urobiline, zodat men in excrementen, die niet onder bijzondere voorzorgsmaatregelen bewaard zijn, meer urobiline dan urobilinogeen kan aantreffen, ook al was de verhouding oorspronkelijk andersom. Deze omzetting wordt begunstigd door de aanwezigheid van zuurstof en door licht; en eerst recht door de aanwezigheid van oxydantia.

Het onderzoek naar de constitutie van urobiline en urobilinogeen bevestigde het reeds op klinische en experimentele gronden aangenomen verband tussen deze stoffen en de afbraakproducten der bloedkleurstof. Het bleek n.l., dat urobiline de volgende formule bezit (Siedel en Meier ('36)):



Het molecuul bestaat dus uit een gestrekte keten van 4 pyrrolkernen. Uit de plaatsing der substituenten is het bewezen, dat deze verbinding ontstaat uit bilirubine, welke stof uit een dergelijke keten bestaat. Bilirubine nu is direct af te leiden van de gesloten ring van 4 pyrrolkernen, die de prosthetische groep in het haemoglobinemolecuul vormt. Urobiline is een schakel in de keten van producten, die bij de afbraak van de bloedkleurstof ontstaan. Deze keten voert via biliverdine en/of bilirubine over mesobilirubinogeen, dat identiek is met urobilinogeen, tot urobiline. De omzetting van bilirubine in mesobilirubinogeen is een reductieproces, die van mesobilirubinogeen in urobiline een oxydatie.

De laatste onderzoekingen hebben geleerd, dat er een stof voorkomt in normale faeces en urine, die sterk op urobiline lijkt en eerst kort geleden als chemisch en fysisch ervan verschillend is herkend: stercobiline (Fischer en Halbach ('35)). Siedel en Grams ('40) pleiten voor de volgende structuurformule, die het beste zou overeenkomen met de chemische verschillen tussen urobiline en stercobiline:



Stercobiline is dus 4 H-atomen rijker dan urobiline. Het onderscheidt zich van urobiline o.a. door zijn optische activiteit en door de grotere weerstand tegen de oxydatie met FeCl<sub>3</sub>. De constitutie maakt het zeer waarschijnlijk, dat ook stercobiline uit bilirubine ontstaat, doch dit geschiedt niet via urobilinogeen. Wel is het bestaan van een aan dit chromogeen analoog voorstadium van het stercobiline waarschijnlijk (Watson ('36)). Over de verhoudingen, waarin de stoffen urobiline en stercobiline naast elkaar voorkomen, is nog zo goed als niets bekend; beide zijn in normale faeces aangetroffen (Halbach ('38)).

Over de normale stofwisseling van urobiline en stercobiline zijn alleen gegevens bekend uit proeven en waarnemingen, waarbij met het verschil tussen de beide stoffen geen rekening is gehouden. Aangezien stercobiline dezelfde reacties geeft, die gewoonlijk voor de bepaling van urobiline gebruikt worden, hebben de onderzoekers vóór '35 beide stoffen gezamenlijk bepaald. Voor een historisch overzicht der theorieën, die naar aanleiding van het urobilinevraagstuk opgesteld zijn, kan verwezen worden naar het uitstekende samenvattende artikel van Royer ('35). De situatie was toen zó, dat genoemde auteur liever spreken wilde van de „enterohepatische kringloop van het urobiline” als van een wet dan als van een theorie. Deze opvatting zegt, dat urobiline (resp. urobilinogeen) alléén in de darm ontstaat uit bilirubine; dat een deel hiervan geresorbeerd wordt en uit het bloed, dat door de v. portae de lever bereikt, door dit orgaan quantitatief verwijderd wordt. Slechts als het aanbod veel groter is dan normaal, of wanneer de leverfunctie te kort schiet, kan een deel van het urobiline (of van het urobilinogeen) de rest van de bloedsomloop bereiken. Dan wordt het door de nieren opgevangen en in de urine uitgescheiden. (Zo geldt de urobilinetest in de urine in de kliniek als een gevoelige reactie op de functie van de lever voor die gevallen, waarin men mag aannemen, dat de productie en de resorptie van



het urobiline normaal is.) Sinds de klassieke en veel geciteerde proeven van Fr. v. Müller op dit gebied heeft het evenwel niet ontbroken aan pogingen om te bewijzen, dat urobiline ook op andere plaatsen dan in de darm kan ontstaan. Een verzameling van argumenten in deze richting kan men vinden in een recente publicatie van Halbach ('38). Deze auteur betreft ook het stercobiline in zijn discussie en breekt een lans voor de hepatogene ontstaanswijze van deze stof. In dat geval zou dus de physiologie van het stercobiline een geheel andere kunnen zijn dan die van urobiline. Het is echter de vraag, in hoeverre sommige der door hem genoemde proeven de toets der kritiek kunnen doorstaan. Dit geldt speciaal voor de reacties met Schlesingers reagens op urobiline in bloedserum (Dymschitz ('28), Brunner ('35)), die zonder spectrophotometrische contrôle eigenlijk niet specifiek genoeg zijn. Een zeer originele en interessante kijk op het urobilinevraagstuk geeft tenslotte Ten Bokkel Huinink ('41). Zijn conclusies komen er voor de ontstaanswijze van urobiline (resp. urobilinogeen) op neer, dat slechts in de darm urobilinogeen ontstaat en wel alleen uit extrahepatisch gevormde bilirubine. De door de lever zelf geproduceerde bilirubine zou daarentegen niet in urobilinogeen worden omgezet.

De bovenstaande opmerkingen geven zeker geen volledige indruk van het urobilineprobleem, doch wel doen zij zien, dat nog lang niet alles over de urobiline- en stercobilinesstofwisseling bekend is, zodat een histologische methode, die ons in staat stelt om deze stoffen in de cellen op te sporen en eventueel te localiseren, dus bijzonder welkom moet zijn.

Voor het aantonen en bepalen van urobiline, zowel als voor stercobiline en de corresponderende chromogenen, zijn voornamelijk twee reacties in gebruik: de reactie van Schlesinger en die met het reagens van Ehrlich (paradimethylaminobenzaldehyd). De eerste reactie is er een op urobiline en stercobiline, de tweede wordt alleen gegeven door de chromogenen. Wenst men met de eerste reactie ook deze „leucoverbindingen” te bepalen, dan voegt men een zwak oxydatiemiddel toe; jodiumtinctuur is geschikt voor dit doel. Wil men bij de tweede reactie ook de kleurstoffen in de bepaling betrekken, dan moet men die reduceren tot de chromogenen.

De betrouwbaarheid dezer reacties in hun uitvoering als quantitative of kwalitatieve methode wordt verschillend beoordeeld. Royer ('35) pleit voor de fluorescentiereactie van Schlesinger, Terwen ('24) voor de kleurreactie met Ehrlich's reagens. Naumann ('36) vergeleek de beide methoden in de kliniek en vond, dat de fluorescentiereactie als kwalitatieve methode betere uitkomsten gaf dan de reactie van Ehrlich. Ten Bokkel Huinink tenslotte verwerpt de reactie van Schlesinger als quantitative methode en houdt zich aan de Watson-Terwen'se uitvoering van de reactie met het aldehydereagens. Wij kozen voor de histologische methode de fluorescentiereactie.

Trachten wij na te gaan, welke fouten er mogelijk zijn bij de



uitvoering van de reactie van Schlesinger, dan blijkt het volgende: De reactie van Schlesinger berust op de geelgroene fluorescentie, die een verbinding tussen urobiline en zink vertoont. Deze fluorescentie wordt volgens Naumann in urine het best zichtbaar, wanneer men het originele voorschrift van Schlesinger volgt en de urine, die niet zuur mag zijn, verdunt met een gelijk deel reagens (een 10 % suspensie van zinkacetaat in alcohol) en filtreert. Men verdeelt de vloeistof over twee buisjes en voegt aan de inhoud van één der buisjes een paar druppels verdund zoutzuur toe. In dat buisje verdwijnt de fluorescentie van het eventueel aanwezige urobilinezink, zodat het als vergelijkingsobject kan dienen. Nadat men de fluorescentie in het andere buisje heeft waargenomen, voegt men aan elk buisje enkele druppels van n/10 jodiumoplossing toe en vergelijkt opnieuw. Een toename in de fluorescentie duidt aan, dat in de vloeistof aanwezig chromogeen geoxydeerd is tot urobiline (resp. stercobiline). Door vergelijking met fluorescerende standaarden kan men de methode tot een quantitative maken. Welke zijn nu de mogelijke fouten bij deze en dergelijke bepalingen?

- a. Niet alleen urobiline reageert met zink onder vorming van een groen fluorescerende verbinding. Dit is zeker zo, want ook het van urobiline chemisch verschillende stercobiline geeft de reactie en wel op volkomen gelijke wijze. Ook in het fluorescentiespectrum is geen verschil waar te nemen. (Fischer en Halbach ('35), Siedel en Meier ('36)). Bovendien toonde Fischer ('11), ('23), ('31) aan, dat nog andere stoffen met pyrrolstructuur, zelfs zulke met slechts 2 pyrrolkernen, met zinkacetaat een groene fluorescentie kunnen vertonen. Hij geeft echter geen fluorescentiespectra. Deze verbindingen verliezen evenwel hun belang als foutenbronnen door het feit, dat zij nog niet in de natuur gevonden zijn. Hetzelfde geldt voor het met zink eveneens groen fluorescerende oxydatieproduct van bilirubine, het choleteline.
- b. Er zijn andere groen fluorescerende stoffen in het reactiemengsel. Deze fout kan ons vooral dan parten spelen, als het zuur in het contrôlebuisje, dat de fluorescentie van de urobilinezinkverbinding uitdooft, ook de storende fluorescentie opheft, zoals dat met de groene fluorescentie van lactoflavine het geval is. Eerst goed loopt men de kans op dergelijke vergissingen als men in het geheel geen controles gebruikt en alleen op de fluorescentie afgaat, zonder spectrophotometrie van het fluorescentielicht, zoals Brunner ('35) deed bij het onderzoek naar het voorkomen van urobiline in bloed. Het was naar aanleiding van dit onderzoek, dat Heilmeyer en Ohlig ('36) wezen op twee stoffen, die aan het serum een fluorescentie kunnen verlenen, welke gelijk is op die van de



urobilinezink-verbinding: lactoflavine en bilirubine. De welbekende spectrale verdeling van het fluorescentielicht van lactoflavine maakt verwisseling met dat van urobilinezink bij spectrophotometrisch onderzoek onwaarschijnlijk. Over de fluorescentie van bilirubine in het serum is niet veel bekend. Dhéré volstaat in zijn zeer volledig gedocumenteerde monographie ('37) met de opmerking, dat oplossingen van bilirubine geen duidelijke fluorescentie vertonen, behalve die in chloroform, welke geel-groen oplicht. Heilmeyer en Ohlig merken evenwel op, dat bilirubine aan het serum een fluorescentiekleur geeft, die wat blauwer is dan die van urobilinezink, zodat ook deze foutenbron spectrophotometrisch geëlimineerd moet kunnen worden.

- c. Er ontstaat tijdens de reactie of tijdens de belichting urobiline, dat oorspronkelijk niet aanwezig was. Dat het eerste heel goed mogelijk is bewijst reeds de toevoeging van jodiumtinctuur aan een oplossing van urobilinogeen, dat onmiddellijk daarop overgaat in urobiline, dat met zink reageert. Bovendien bewezen Barrenscheen en Weltmann ('23) bij hun critiek op urobilinebepalingen volgens Adler, dat ook uit andere stoffen dan urobilinogeen stoffen kunnen ontstaan, die de urobiline-reactie geven. Adler bepaalde het gehalte van bloedserum aan urobiline en urobilinogeen door middel van de reactie van Schlesinger en voegde soms daarvoor jodium als mild oxydans toe. Barrenscheen en Weltmann toonden echter aan, dat er uit het serumbilirubine onder de invloed van het jodium stoffen ontstonden, die met zink een groene fluorescentie vertonen, welke niet van die van urobilinezink is te onderscheiden. Een aanduiding, dat bij lang belichten in het reactiemengsel urobiline kan ontstaan, geven Bierry en Larguier des Blancels ('11). Het was hun opgevallen, dat in een oplossing van chlorophyll in alcohol onder de invloed van de bestraling met kwiklicht een product ontstond, dat met Ehrlichs en Schlesingers reagentia positief reageerde. Gouzon ('33) onderzocht dit proces nader en fotografeerde de fluorescentiespectra van porphyrine- en chlorophylloplossingen, waaraan zink was toegevoegd, aan het begin en aan het einde van een langdurige bestraling met ultraviolet licht. Hij zag dan, dat de streep in het rood, die de fluorescentie van chlorophyll en van porphyrine kenmerkt, plaats had gemaakt voor de voor urobilinezink karakteristieke band in het groen en het geel.
- d. Tenslotte is het mogelijk, dat in het reactiemengsel factoren aanwezig zijn, die de vorming of de fluorescentie van de urobilinezinkverbinding verhinderen. Op een van beide wijzen werkt de overmaat zuur in het contrôlebuisje. In hoeverre fluorescentie-uitdovende factoren de uitslag van de reactie van



Schlesinger kunnen beïnvloeden, is niet bekend. Bij quantitative bepalingen met deze reactie moet met de mogelijkheid van fluorescentie-uitdoving zeker rekening gehouden worden.

Deze opsomming van de bekende foutenbronnen der reactie van Schlesinger maakt duidelijk, dat men de uitkomsten van deze reactie in zijn gewone vorm slechts met reserve kan aanvaarden, doch dat de betrouwbaarheid veel groter wordt, wanneer men het fluorescentielicht spectrophotometrisch onderzoekt. Op deze voorwaarde is een poging gerechtvaardigd, een uitvoeringsvorm der reactie te vinden, die het aantonen van urobiline en sterco-biline in coupes mogelijk maakt.

Te meer, daar het fluorescentiespectrum van de urobilinezinkverbinding uit de onderzoekingen van Dhéré en Roche ('31) goed bekend leek te zijn. De auteurs geven als voornaamste band in dit spectrum op: die van 515 tot 527  $m\mu$ , naar de rode zijde gevolgd door enkele minder intensieve banden, waarvan de dichtsbijzijnde, die van 540 tot 560  $m\mu$ , bij langere belichting op de spectrogrammen versmelt met de eerdergenoemde. Deze band bij 540 tot 560  $m\mu$  was evenwel niet zo duidelijk bij een monster van Terwens urobiline, als bij een derivaat van het synthetische mesobilirubinogeen.

Wij onderzochten urobilinemonsters na toevoeging van zinkacetaat in alcoholische oplossing en kwamen tot de volgende resultaten:

Binnen het meetbereik werd slechts één band, die in de spectrophotometrische curven werd weergegeven door een steile top bij 510 en 520  $m\mu$ , gevonden. Deze metingen betreffen een urobilinemonster van Terwen, een waterig faeces-extract en de urine van een patient met uitgesproken urobilinurie. Deze uitkomsten leken zo overtuigend, dat wij een oplossing van zuivere urobiline bij een muis intraperitoneaal inspotten, het dier na een kwartier doodden en het mesenterium na een korte behandeling met zinkacetaat in alcohol via xylol insloten in paraffineolie en onder het fluorescentiemicroscopie onderzochten. In het mesenterium vonden wij zeer helder groen fluorescerende strengen, waarschijnlijk bloed of lymfevaten, afwisselend met veel minder duidelijk oplichtende gedeelten.

De meting liet evenwel niet de verwachte top bij 510 en 520  $m\mu$  zien, doch een bredere top, die zich uitstrekte van 510 tot 530  $m\mu$ , zodat de overeenkomst met de reeds bekende curven niet zeer bevredigend was. Eerst later bleek, dat met zuivere urobiline ook een dergelijke brede top in de curve is te bereiken, door de omstandigheden, waaronder de zuivere urobilinezinkverbinding gemeten wordt, beter aan die waarbij de weefsels onderzocht worden, gelijk te maken. Het bleek n.l., dat urobiline, dat op een objectglas wordt opgelost en gemengd met een alcoholische zinkacetaat-oplossing en vervolgens gedroogd en ingesloten in paraffineolie, bij meting eveneens de top van 510 tot 530  $m\mu$  vertoont, op volmaakt gelijke wijze als de urobiline, die kunstmatig in weefsels gebracht is. Eerst toen ons de invloed, die de omstandigheden, waaronder de urobilinezink-



verbinding onderzocht wordt, uitoefenen op de details van het fluorescentiespectrum, duidelijk geworden was, stond de weg tot nieuwe experimenten over de beste wijze van behandeling der coupes open.

### Methode.

Een histologische methode voor het aantonen van urobiline in de cel zou er als volgt uit kunnen zien: van het weefsel worden coupes vervaardigd, op die coupes laat men een zinkacetaat-bevatend reagens inwerken en men onderzoekt de coupes vervolgens in een geëigend insluitmiddel onder het fluorescentiemicroscop. Vindt men in de dusdanig behandelde coupes groene fluorescentie, en in onbehandelde coupes niet, dan is de aanwezigheid van urobiline waarschijnlijk, doch voldoende mate van zekerheid verkrijgt men eerst door het spectrophotometrisch onderzoek van de gevonden fluorescentie. Daarbij moet men er zorg voor dragen, dat de urobiline inderdaad door het reagens bereikt wordt op de plaats, waar dit in het levende organisme aanwezig is. Tijdens de bewerkingen, die het weefsel ondergaat, voordat het als ingesloten coupe onder het fluorescentiemicroscop ligt, mogen dus geen media gebruikt worden, die urobiline of het reactieproduct oplossen, tenzij deze stoffen van te voren dusdanig in de cel gefixeerd worden, dat ook oplossende media hen niet uit de coupe verwijderen of in de cel verplaatsen. De mogelijkheid om het weefsel slechts te behandelen met vloeistoffen, waarin urobiline en stercobiline zowel als hun chromogenen en de reactieproducten niet oplossen (xylol, paraffineolie e.d.), komt niet in aanmerking, daar niet alleen de praeparaten bij een dergelijke behandeling histologisch niet fraai zijn, doch bovendien een zinkverbinding, die in een dergelijk oplosmiddel wordt aangeboden, niet met urobiline reageert. Dit bewezen proeven, die wij deden met urobilinepartikeltjes op een objectglas, toegedekt met een dekglas. Indien men deze partikels onder het fluorescentiemicroscop beziet, dan vindt men slechts de rode fluorescentie van het vaste urobiline. Laat men dan, tijdens de waarneming, van opzij een oplossing van zinkacetaat in alcohol toevoelen, dan ziet men hoe het urobiline snel oplost, terwijl zich de vorming van de urobilinezink-verbinding kenbaar maakt door de intensief groene fluorescentie, die de vloeistof aanneemt. Iets dergelijks kan men waarnemen, indien men in plaats van aethylalcohol, methyl- of isobutylalcohol gebruikt als oplosmiddel voor het zinkacetaat, of glycerine en, in mindere mate, water. Het urobiline lost evenwel niet op en er ontstaat geen groene fluorescentie in suspensies van zinkacetaat in xylol, tetrachloorkoolstof, aether e.d. P. W. O. Wyga, chem. drs., bereidde voor ons zinkstearinaat (waarvoor wij hem hier hartelijk dank zeggen), doch in een oplossing van deze stof in paraffineolie vormde zich evenmin een groen fluorescerende urobilinezink-verbinding. Als bruikbare zinkzouten voor de fluorescentieproef op urobiline noemt Steensma ('18) het

acetaat en het chloride; als geschikte en gelijkwaardige oplosmiddelen hiervoor: methylalcohol, aethylalcohol, glycerine en aceton. In deze stoffen lossen alle in aanmerking komende substanties: urobiline, stercobiline enz. op. De reactie op urobiline „in situ” moet dus geschieden met een urobiline-oplossend reagens. Nu blijkt evenwel, dat bij fixatie der celeiwitstoffen althans een deel van het aanwezige urobiline dusdanig verankerd wordt, dat het door een kort verblijf in alcohol niet uit de coupes verwijderd wordt. Daarbij behoudt het urobiline het vermogen om te reageren met zinkacetaat onder vorming van het fluorescerende product. Bij een langdurig oponthoud in de alcoholische zinkacetaat-oplossing lost het urobilinezink evenwel uit de coupes op, zodat het reagens slechts kort mag inwerken en voor de observatie vervangen moet worden door een inactief insluitmiddel. Hiertoe leent zich paraffinum liquidum, waarin de urobilinezink-verbinding niet oplost en haar fluorescentie behoudt.

De techniek, die wij op grond van deze overwegingen uitwerkten en beproefden op weefsels, die veel urobiline bevatten, is de volgende:

- a. Snijden van het verse weefsel op het vriesmicrotoom met onderkoeld mes (Schultz-Brauns ('32)) en opplakken van de coupe op de voor deze methode aangegeven wijze;
- b. korte fixatie (enkele seconden) in alcohol 70 %, resp. in alcohol 70 %, verzadigd met zinkacetaat, of in alcohol 70 %, verzadigd met zinkacetaat, waaraan enkele druppels tinctura jodii zijn toegevoegd;
- c. snel doorvoeren door alcohol absolutus (resp. door alc. abs. + zinkacetaat, of door alc. abs. + zinkacetaat + J);
- d. via xylol inbedden in paraffineolie.

De door Schultz-Brauns aangegeven vóórfixatie van de coupe in osmiumzuur-damp moet vervallen wegens de sterk uitdovende werking van zware metalen op fluorescentieverschijnselen.

Zoals uit de beschrijving van de techniek blijkt, werden telkens drie categorieën van preparaten vervaardigd, n.l. coupes, die tijdens de gehele bewerking niet met zink in aanraking kwamen, coupes, die met zinkacetaat behandeld werden en coupes, waar zowel jodium als zinkacetaat op inwerkten. Zo werd getracht om tot een differentiatie te geraken tussen de in de cellen aanwezige kleurstoffen en hun chromogenen. In de preparaten van de eerste categorie kan dan geen fluorescentie van de urobilinezink-verbinding optreden, in die van de tweede soort alleen fluorescentie tengevolge van het aanwezige urobiline en in de derde categorie van coupes zou de fluorescentie van de door het jodium geoxydeerde chromogenen daar nog bijkomen. Soms vindt men evenwel in de niet met zink behandelde preparaten reeds de typische



fluorescentie, zij het niet in die sterkte, welke de zink-praeparaten tonen. Of in dat geval het weefsel of wellicht de reagentia genoeg zink bevatten in een vorm, die met het urobiline reageren kan, of dat urobiline ook zonder zink-toevoeging groen kan fluoresceren, is niet uitgemaakt. (Dat alle weefsels wel enig zink bevatten is zeker (Sluiter ('30) en evenzo is het mogelijk, dat de alcohol die bij de behandeling van de coupes gebruikt wordt sporen van dit metaal bevat. Dat zuivere urobiline in oplossing groenig kan fluoresceren, toonden Siedel en Meier aan voor de oplossing in chloroform van het hydrochloride.) Tussen de praeparaten, die met en zonder toevoeging van jodium aan het zink-acetaatreagens waren behandeld, werd nooit enig verschil opgemerkt. De meest plausibele verklaring hiervan is, dat al het aanwezige urobilinogeen in de dunne coupe door de in de lucht en de reagentia aanwezige zuurstof volledig tot urobiline geoxydeerd wordt, zodat de toevoeging van een oxydans overbodig is. Hetzelfde ziet men, in veel langzamer tempo, in urine en faeces (o.a.: Naumann). Coupes van weefsels, waarin het gehalte aan urobilinogeen, door mij in oplossing bereid door reductie van een faecussuspensie met Mohr's zout volgens Terwen, kunstmatig verhoogd was, lieten evenmin enig verschil tussen beide categorieën van praeparaten zien als die van weefsels, waarin het urobiline-gehalte verhoogd was.

De op de boven aangegeven wijze vervaardigde coupes werden onder het fluorescentiemicroscop bekeken en de delen, die daarvoor in aanmerking kwamen, werden spectrophotometrisch onderzocht met de in het vorige hoofdstuk beschreven opstelling. Hiertoe moet het normale dekglas, waarmede het praeparaat na de vervaardiging werd afgedekt, opzij geschoven worden en vervangen worden door het euphos-dekglas. Hiervan werd n.l. steeds eenzelfde exemplaar gebruikt, want in de ijking van de apparatuur is de absorptie van dit speciale dekglas verwerkt.

De opwekkende straling bestond voornamelijk uit de band bij  $366\text{ m}\mu$ . Het zal blijken, dat voor het spectrophotometrisch onderzoek op urobiline, het gehele spectrum van 450 tot  $570\text{ m}\mu$  gemeten moet kunnen worden. De opwekkende stralen moeten bij onze opstelling dus buiten dit gebied vallen, en de enige golflengte, korter dan  $450\text{ m}\mu$ , die bij de bestaande lichtbronnen en filters in voldoende sterkte enigszins zuiver geïsoleerd kan worden, is die van de genoemde band bij  $366\text{ m}\mu$ . (Policard en Leulier ('24) toonden aan, dat het product van de reactie van Schlesinger ook bij bestraling met deze golflengte intensief fluoresceert. Deze waarneming is niet in strijd met de recente publicatie van Pruckner en Stern ('37) over de lichtabsorptie van urobiline en verwante stoffen. Weliswaar geven deze auteurs geen absorptiecurven van het urobilinezink-complex, doch wel die van urobiline, van kryptopyrromethen en van het zinkcomplex van de laatste stof. Al deze stoffen vertonen, behalve de karakteristieke absorptie



in het zichtbare deel van het spectrum, ook een duidelijke band in het gebied van 366  $m\mu$ , en de overeenkomst tussen al de gepubliceerde curven maakt het zeer waarschijnlijk, dat de absorptie van het urobilinezink-complex in dezelfde streek eveneens aanzienlijk is.) De stabiliteit van de urobilinezink-verbinding in dit ultraviolette licht is vrij groot.

In het fluorescentiebeeld van de praeparaten overheerst de blauwe fluorescentie. Bindweefselvezels fluoresceren helder blauw, veel minder helder licht het protoplasma van de cellen op. Hier en daar ziet men (althans in de op de boven aangegeven wijze vervaardigde praeparaten) bindweefselcellen, beladen met lichtblauwe korreltjes. Elders zijn deze partikeltjes in het protoplasma helder geel. (Voor nadere opgaven over de eigen fluorescentie in histologische praeparaten zij verwezen naar de monographie van Haitinger ('38). Deze auteur wijdt weliswaar zelf de meeste aandacht aan de secundaire fluorescentie, doch hij geeft waardevolle literatuuropgaven op het punt van de primaire weefsel-fluorescentie.) De ruimten tussen de weefseldelen zijn min of meer donker, doch hoe betrekkelijk dit donker is, blijkt, wanneer men in het praeparaat een pigmentcel opzoekt, zoals die in de lever van de kikker zoveel voorkomen. In deze cellen ziet men geelrood fluorescerende lichamen, doch ook enkele volmaakt zwarte gedeelten: de pigmentbrokken zijn vrij van elke fluorescentie en absorberen alle licht. Vergelijking van de helderheid van deze zwarte gedeelten met die van de weefselspleten leert, dat de ultraviolette stralen niet alleen in het weefsel, doch ook in het objectglas, in de paraffineolie of in het euphosglas of wellicht in alle drie fluorescentie opwekken. Deze fluorescentie, die als een licht waas over het beeld heen ligt, stoort de waarneming niet merkbaar, doch moet bij de meting in rekening gebracht worden.

Wanneer men gewend raakt aan het beeld van de weefselcouples in het eigen fluorescentielicht, wordt het allengs mogelijk om histologische en microscopisch-anatomische bijzonderheden te herkennen. De kernen zijn vaag in hun omtrekken te zien, grotere bloedvaten verraden zich door de fluorescentie van de bindweefselvezels in de wand, in de lever kan men celbalken onderscheiden en duidelijk is te zien welke openingen bloedcapillairen voorstellen. In praeparaten van de kikkerlever zijn de parenchymcellen veelal wat geschrompeld, zodat zij alle door een smal spleetje van hun burens gescheiden zijn. In de menselijke lever vindt men in het midden der celbalken geelrood fluorescerende bolletjes, waarvan de fluorescentiekleur na korte bestraling overgaat in geel-groen, in de sterzellen van v. Kupffer liggen helder fluorescerende „brokken" van weer een andere tint geel en men geraakt onwillekeurig diep onder de indruk van de schoonheid der beelden, die deze methodiek ons levert.

Alle genoemde kleuren en kleurnuances kunnen gemeten wor-



den, doch deze metingen hebben eerst zin, als zij ons iets leren omtrent de aard der fluorescerende stoffen. Dit nu eist de kennis van de fluorescentie en speciaal van de fluorescentiespectra van deze stoffen in zuivere toestand. Derhalve zal hier verder alleen bericht worden over de fluorescentiespectra van deze weefselcoupes in verband met het onderzoek naar het voorkomen van een stof, waarvan het fluorescentiespectrum ons goed bekend was, het urobiline- (resp. het stercobiline-) zink.

Vergelijkt men de coupes, die met zinkacetaat behandeld werden, met die, welke niet met dit reagens in aanraking kwamen, dan valt direct op, dat de blauwe fluorescentie in de eerste categorie over het algemeen helderder is. Blijkbaar fluoresceert het denaturatieproduct van de bestanddelen der cellen helderder bij fixatie door alcohol met zinkacetaat dan bij fixatie met alcohol alleen. Bevat de coupe bovendien veel urobiline, dan springt de groene fluorescentie van de urobilinezink-verbinding dadelijk in het oog. Veel minder duidelijk is deze groene fluorescentie in coupes, waarin slechts weinig urobiline aanwezig is, zoals in die van de normale kikkerlever. In dat geval kan het slechts een gering verschil in tint van een deel ener cel zijn, dat ons aanleiding geeft tot een spectrophotometrisch onderzoek.

Dit onderzoek verloopt in de praktijk als volgt: Het deel van de cel, waarvan de fluorescentie ons interesseert, wordt onder het gaatje van de wijzer W in het oculair gebracht en het totaal reflecterend prisma  $P_2$  komt weer op het oculair. Indien men nu gaat meten bij 450, 470  $m\mu$ , enz. en na afloop de meting voor de zekerheid herhalen wil, dan blijkt het, dat de waarden de tweede maal aanzienlijk veel lager liggen dan de eerste maal het geval was. Dit is een gevolg van de afname van de blauwe fluorescentie van de celbestanddelen onder invloed van de ultraviolette stralen. Aangezien de ervaring mij geleerd heeft, dat de fluorescentie van de urobilinezink-verbinding niet zo gevoelig is voor deze stralen, is er in dit geval niets tegen, om te wachten met de definitieve meting, totdat de fluorescentie van de andere celbestanddelen zich in zoverre gestabiliseerd heeft, dat enige metingen achtereenvolgende bevredigende overeenkomst tonen. Verricht men op deze wijze metingen op verschillende plaatsen in de coupe, dan kunnen zich verschillen in de curven voordoen, die hierna ter sprake zullen komen. Vooraf moet evenwel nog een correctie besproken worden, die noodzakelijk is, om de invloed van de storende fluorescentie van objectglas en insluitmedium te elimineren.

Men mag aannemen, dat deze storende fluorescentie niet alleen in de weefselspletten, waar zij waargenomen wordt, doch ook in het fluorescentielicht van de coupe voorkomt en wel overal in gelijke sterkte. De absorptie van dunne weefselcoupes is n.l. zo gering (pigmentcellen uitgezonderd), dat dit storende licht, zo het onder de coupe, in het objectglas, ontstaat, door de coupe onverzwakt wordt doorgelaten en dat het ultraviolette licht, dat



de storende fluorescentie *in* of *boven* de coupe in paraffineolie of euphosglas opwekt, door de bestanddelen van de cellen niet merkbaar sterker verzwakt wordt dan door de paraffineolie in de weefselspleten. Het gemeten fluorescentielicht bestaat dus uit de som van het fluorescentielicht uit de celbestanddelen en het storende fluorescentielicht. Wil men het eigen fluorescentielicht van de cel bepalen, dan moet men de intensiteit van het storende fluorescentielicht voor elke golflengte onder gelijke omstandigheden geïsoleerd meten en de gevonden waarden aftrekken van die, welke bij de meting aan het celonderdeel gevonden werden. Men bepaalt de storende fluorescentie door, zonder iets aan de opstelling te veranderen, de coupe na een meting aan een celonderdeel zover te verschuiven, dat zich een weefselspleet onder het gaatje in de oculairwijzer bevindt en dan nog een meting uit te voeren. Men kan dan een curve berekenen van het totale licht, dat bij de meting aan het celonderdeel werd gevonden (a), en een van het storende licht, dat bij de meting aan de weefselspleet bepaald werd (b). Het verschil van a en b geeft dan de gezochte waarden voor de eigen fluorescentie van het celonderdeel. Aangezien echter voor de berekening van de curven a en b de afgelezen schaaldelen met dezelfde factoren vermenigvuldigd worden, kan men eenvoudiger deze aflezingen van elkaar aftrekken en uit de verschillen de enige curve, die ons interesseert, n.l. die van de eigen fluorescentie van het celonderdeel, door vermenigvuldiging met de genoemde factoren berekenen. Dat het hiervoor noodzakelijk is, dat de afgelezen waarden van het sectorendiaphragma recht evenredig zijn met de intensiteiten van het doorgelaten licht spreekt vanzelf (hier geven wij dus eerst de nadere motivering van deze reeds op blz. 20 gestelde eis). Vindt men dus bijv., dat het diaphragma voor het licht uit een celonderdeel bij  $450 \text{ m}\mu$ ,  $30^\circ$  moet openstaan en bij  $470 \text{ m}\mu$ ,  $28^\circ$  en zijn deze waarden voor het licht uit een weefselspleet resp.  $10^\circ$  en  $11^\circ$ , dan blijken er in de waarden van  $30^\circ$  en  $28^\circ$  dus slechts resp.  $20^\circ$  en  $17^\circ$  voor rekening van het eigen fluorescentielicht van het celonderdeel te komen. Deze waarden worden dan gebruikt voor de berekening van de spectrophotometrische curve.

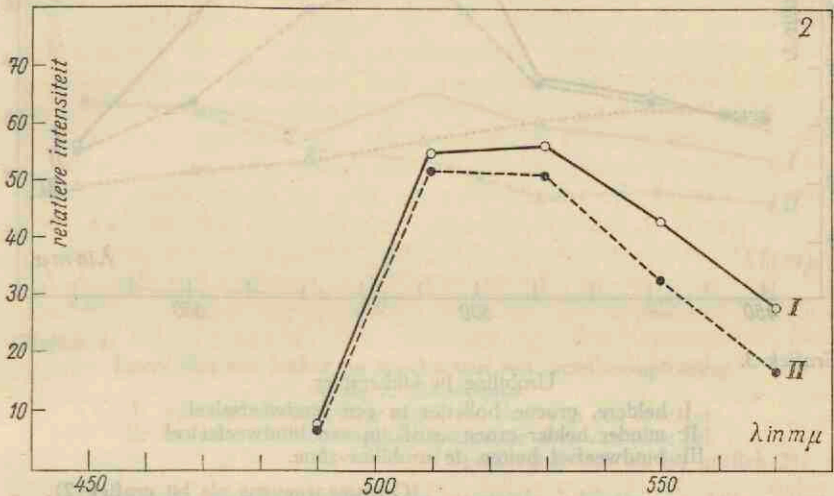
Op de boven beschreven wijze vervaardigden wij van allerlei materiaal coupes, die vervolgens spectrophotometrisch op urobiline (stercobiline) onderzocht werden. In het nu volgende deel zullen enkele van deze proeven als voorbeelden, die in hun volgorde de gedachtengang, die aan dit onderzoek ten grondslag ligt, weergeven, beschreven worden.

#### Proeven.

- a. Aan een alcoholische oplossing van urobiline werd op een objectglas een oplossing van zinkacetaat in alcohol toegevoegd.



Nadat de alcohol verdampt was, werd de droogrest in paraffineolie ingesloten en onderzocht als voor de weefselcoupes beschreven is. Het amorphe neerslag fluoresceerde zeer helder groen: de grafiek 2 laat de relatieve intensiteitsverdeling van het fluorescentielicht zien.



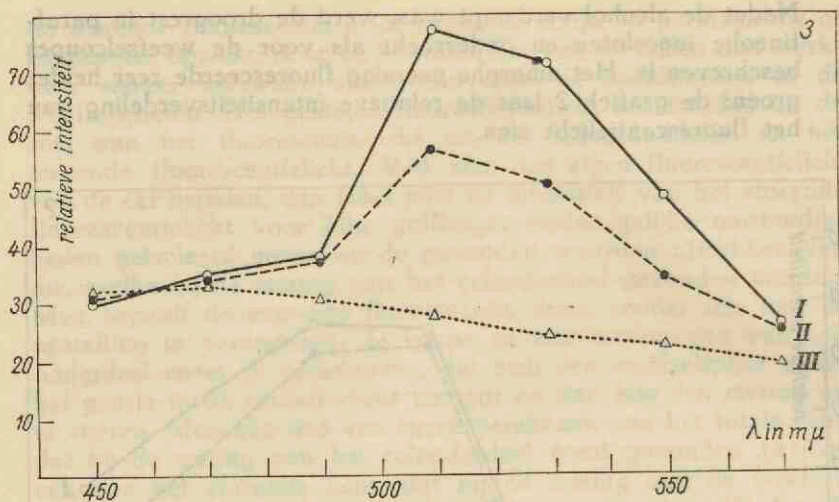
Grafiek 2.

Urobiline — Zn — acetaat-mengsel, gedroogd en ingesloten in paraffineolie.

I en II: 2 urobilinemonsters van verschillende herkomst.

(Opwekkende straling v.n.l. 366 mμ, coll.spleet en oc.spleet corresponderend met 20 mμ dispersie).

- b. In de dijspier van een kikker werden enige korreltjes urobiline gebracht en na een kwartier werden van de spier op de beschreven wijze praeparaten vervaardigd. In het fluorescentiebeeld toonden vele spiervezels (in het met zinkacetaat behandelde praeparaat) een diffuse, heldergroene fluorescentie. Ook het bindweefsel was hier en daar diffuus groen. Op sommige plaatsen waren cellen te zien, die in het protoplasma talrijke, op elkaar gepakte, zeer helder groen fluorescerende, bolletjes vertoonden. In andere cellen was de groen fluorescerende substantie zo fijn als stof te zien. Grafiek 3 toont de fluorescentiespectra van het protoplasma van deze soorten van bindweefselcellen en van bindweefsel buiten de urobiline-zone.
- c. In de v. abdominalis van een kikker (waarbij deze vene, zoals bekend is, een tak van de v. portae is) werd een oplossing van urobiline in een 0,6 % NaCl-oplossing, waaraan terwille



Grafiek 3.

## Urobiline in kikkerspier.

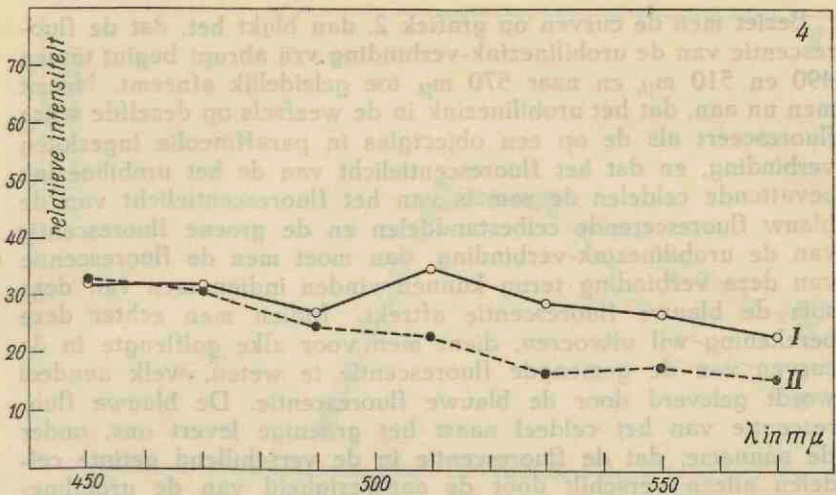
- I: heldere, groene bolletjes in een bindweefselcel.  
 II: minder helder groen „stof" in een bindweefselcel.  
 III: bindweefsel buiten de urobiline-zône.

(Opnamegegevens als bij grafiek 2).

van de oplosbaarheid van het urobiline een weinig ammonia liquida was toegevoegd, geïnfundeerd. In de praeparaten van de lever bevatten de cellen, die naar hun ligging als stercellen imponeerden, dezelfde groen fluorescerende bolletjes als de onder b. beschreven bindweefselcellen. Het fluorescentiespectrum van deze bolletjes was aan dat van die in de genoemde bindweefselcellen identiek. In niet met zink behandelde praeparaten was de fluorescentie in deze cellen veel geringer en in leverpraeparaten, afkomstig van normale kikkers, vindt men in deze cellen alleen blauw fluorescerende bolletjes.

- d. In de v. abdominalis van een kikker werd een oplossing van urobiline in een mengsel van gelijke delen fosfaatbuffer (pH: 7,2) en 0,6 % NaCl-oplossing geïnfundeerd. In de lever van deze kikker vonden wij geen opvallende fluorescentie van de in de bloedvaten gelegen cellen, doch de van de bloedcapillairen afgekeerde zijde van de parenchymcellen toonden in de met zinkacetaat behandelde praeparaten een duidelijk groenere tint dan de aan de bloedcapillairen grenzende gedeelten. De curven van elk dezer gedeelten toont de grafiek 4. In de controle-paerparaten was dit verschil in fluorescentie niet waar te nemen.





Grafiek 4.

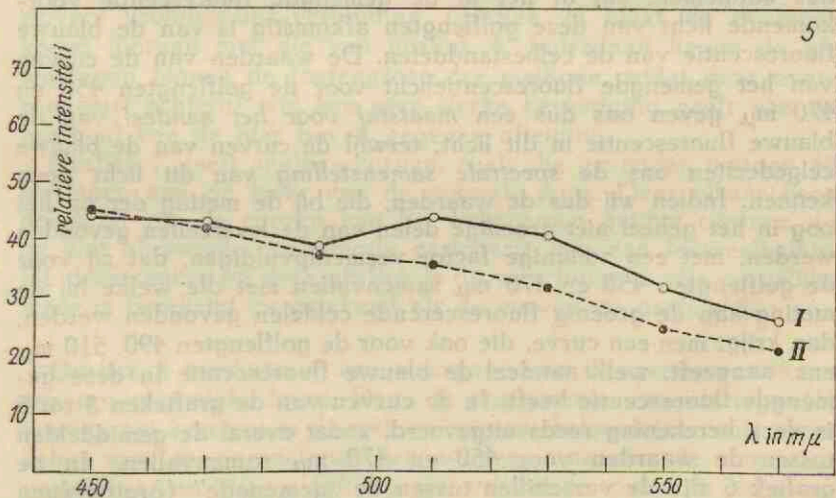
Lever van een kikker na injectie van een urobiline-oplossing  
in de v. abdominalis.

I: van een bloedcapillair afgekeerd deel van een levercel.

II: het aan een bloedcapillair grenzende deel van deze cel.

(Opnamegegevens als bij grafiek 2).

- e. Vervolgens werden levers van normale kikkers op deze wijze onderzocht. Ook hierbij werden de in de vorige proef vermelde verhoudingen, zij het veel minder duidelijk, gevonden. De curven geeft grafiek 5.



Grafiek 5.

Normale kikkerlever, behandeld met Zn-reagens.

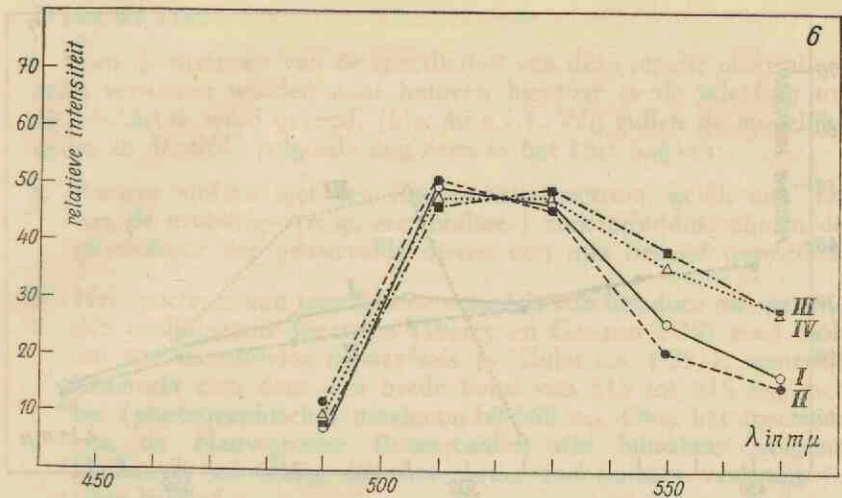
I: van een bloedvat verwijderd deel van een parenchymcel.

II: aan een bloedvat grenzend deel van die cel.

(Opnamegegevens als bij grafiek 2).

Beziet men de curven op grafiek 2, dan blijkt het, dat de fluorescentie van de urobilinezink-verbinding vrij abrupt begint tussen 490 en 510  $m\mu$ , en naar 570  $m\mu$  toe geleidelijk afneemt. Neemt men nu aan, dat het urobilinezink in de weefsels op dezelfde wijze fluoresceert als de op een objectglas in paraffineolie ingesloten verbinding, en dat het fluorescentielicht van de het urobilinezink bevattende celdelen de som is van het fluorescentielicht van de blauw fluorescerende celbestanddelen en de groene fluorescentie van de urobilinezink-verbinding, dan moet men de fluorescentie van deze verbinding terug kunnen vinden indien men van deze som de blauwe fluorescentie aftrekt. Indien men echter deze berekening wil uitvoeren, dient men voor elke golflengte in de curven van de gemengde fluorescentie te weten, welk aandeel wordt geleverd door de blauwe fluorescentie. De blauwe fluorescentie van het celdeel naast het groenige levert ons, onder de aanname, dat de fluorescentie in de verschillend getinte celdelen alleen verschilt door de aanwezigheid van de urobilinezink-verbinding, wel de *spectrale samenstelling*, doch niet de *intensiteit* van de blauwe fluorescentie in het urobilinehoudende deel, want de coupes zijn niet overal even dik en het protoplasma is niet overal even dicht gevoegd, zodat het heel goed mogelijk is, dat de blauwe celfluorescentie in de urobiline bevattende celdelen niet dezelfde absolute waarde heeft als die in de delen, welke geen urobiline bevatten. Nu blijkt echter uit de curven op grafiek 2, dat de urobilinezink-verbinding geen meetbare fluorescentie vertoont bij de golflengten 450 en 470  $m\mu$ . Men mag dus aannemen, dat al het in de gemengde fluorescentie voorkomende licht van deze golflengten afkomstig is van de blauwe fluorescentie van de celbestanddelen. De waarden van de curven van het gemengde fluorescentielicht voor de golflengten 450 en 470  $m\mu$  geven ons dus een *maatstaf* voor het aandeel van de blauwe fluorescentie in dit licht, terwijl de curven van de blauwe celgedeelten ons de *spectrale samenstelling* van dit licht doen kennen. Indien wij dus de waarden, die bij de meting der op het oog in het geheel niet groenige delen van de levercellen gevonden werden, met een zodanige factor vermenigvuldigen, dat zij voor de golflengten 450 en 470  $m\mu$  samenvallen met die welke bij de meting aan de groenig fluorescerende celdelen gevonden werden, dan krijgt men een curve, die ook voor de golflengten 490, 510  $m\mu$  enz. aangeeft, welk aandeel de blauwe fluorescentie in deze gemengde fluorescentie heeft. In de curven van de grafieken 3 tot 5 is deze berekening reeds uitgevoerd, zodat overal de gemiddelden tussen de waarden voor 450 en 470  $m\mu$  samenvallen. In de grafiek 6 zijn de verschillen tussen de „gemengde” (protoplasma met groen fluorescerende stof) en de „blauwe” (protoplasma zonder groen fluorescerende stof) curven uitgezet en wel op gelijke schaal, zodat in elke curve het gemiddelde tussen de





Grafiek 6.

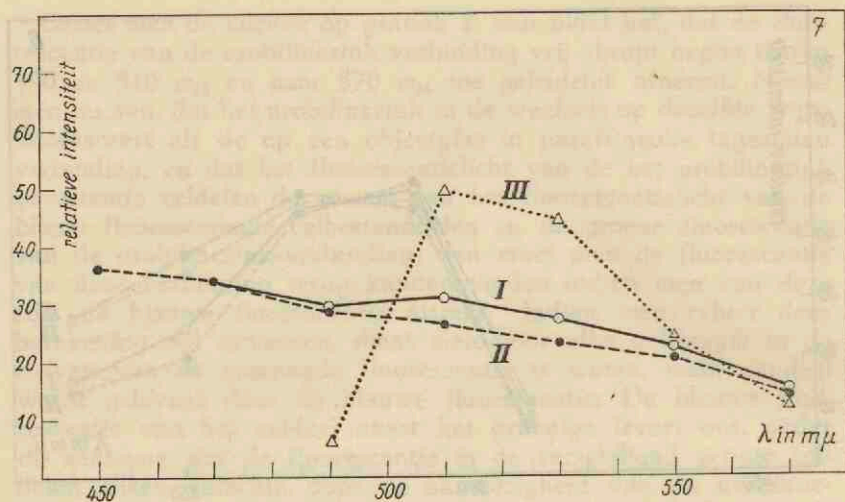
Verschilcurven der grafieken 3, 4 en 5, op gelijke schaal uitgezet.

- I: I—III, grafiek 3;
- II: II—III, grafiek 3;
- III: I—II, grafiek 4;
- IV: I—II, grafiek 5.

waarden bij 510 en 530  $m\mu$ , 48 bedraagt. Deze curven geven dus het „groene” aandeel in de gemengde fluorescentie weer. Bij vergelijking van de curven van de groene fluorescentie van de zuivere urobilinezink-verbinding (grafiek 2) blijkt de overeenkomst hiervan met die van grafiek 6. Inderdaad liggen de afwijkingen binnen de foutengrens der methode, zodat deze overeenkomst achteraf wel een zeer sterke bevestiging geeft van de juistheid van de hier boven gegeven afleiding.

Grafiek 7 geeft analoge curven, zoals die gevonden werden bij metingen aan de lever van de normale muis. Over elkaar heen getekend zijn de curven van het licht groen getinte centrum en de wat blauwiger oplichtende periferie van een levercelbalkje. De derde curve op deze grafiek is de verschilcurve, die op gelijke wijze is berekend en getekend als de curven op grafiek 6.

Grafiek 8 tenslotte, is een weergave van de metingsresultaten aan een menselijke lever. Door de postmortale veranderingen(?) konden wij evenwel in de met zinkacetaat behandelde coupe geen delen van de parenchymcellen vinden, waarvan de curve de verheffing van 510 tot 530  $m\mu$  niet vertoonde, zodat de „blauwe” curve in dit geval afkomstig is van een meting aan de onbehandelde controlecoupe. De overeenkomst van de verschilcurve met de curven van grafiek 2 is, wellicht tengevolge hiervan, niet zo fraai als in de vorige gevallen.



Grafiek 7.

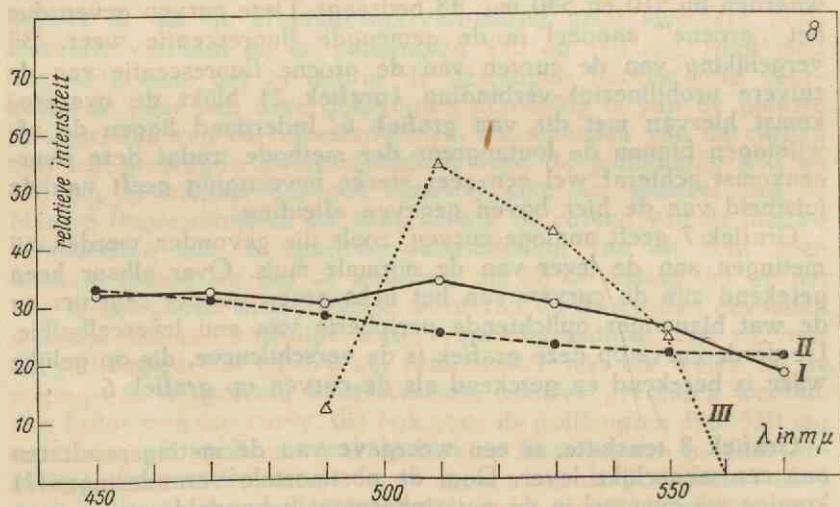
Muizenlever.

I: groenig fluorescerend centrum van een levercelbalkje.

II: meer blauw fluorescerende periferie van dit levercelbalkje.

III: verschilcurve van I en II.

(Opnamegegevens als bij grafiek 2).



Grafiek 8.

Menselijke lever.

I: groenig fluorescerend protoplasma in het met zinkacetaat behandelde preparaat.

II: blauw fluorescerend levercel-protoplasma in het controle-preparaat.

III: verschilcurve van I en II.

(Opnamegegevens als bij grafiek 2).



## Discussie.

Voor de discussie van de specificiteit van deze reactie moet allereerst verwezen worden naar hetgeen hierover in de inleiding tot dit hoofdstuk werd gezegd, (blz. 40 e.v.). Wij zullen de mogelijkheden in dezelfde volgorde nog eens in het kort nagaan:

- a. Andere stoffen met een fluorescentiespectrum, gelijk aan dat van de urobiline- (resp. stercobiline-) zinkverbinding zijn in de physiologie der gewervelde dieren nog niet bekend geworden.
- b. Het spectrum van lactoflavine verschilt van het door ons gevonden urobilinezink-spectrum (Bierry en Gouzon ('35) e.a.), ook dat van lactoflavine in weefsels (v. Euler c.s. ('35)), want dit kenmerkt zich door een brede band van 515 tot 615  $m\mu$ , met het (photographische) maximum bij 560  $m\mu$ . Over het spectrum van de blauwgroene fluorescentie, die bilirubine volgens Heilmeyer en Ohlig aan het serum zou kunnen verlenen, is niets bekend.
- c. Dat urobiline, of een stof, die met zink een dergelijke fluorescentie geeft, in de coupe ontstaat, is mogelijk door de inwerking van jodium op bilirubine, doch ook in de niet met jodium behandelde coupes werd de beschreven fluorescentie gevonden. Tegen het ontstaan van urobiline uit porphyrine onder inwerking van de ultraviolette bestraling pleit het ontbreken van de rode porphyrine-fluorescentie bij het begin van de waarneming en het feit, dat de „urobilinetop” reeds waar te nemen is, vóórdat de blauwe celfluorescentie zich gestabiliseerd heeft, dus op een moment, dat de ultraviolette straling nog maar kort heeft ingewerkt.

Wel moet men rekening houden met de mogelijkheid, dat door de postmortale veranderingen het urobiline niet alleen kan wegdiffunderen, maar dat bovendien het totale gehalte van de lever aan urobiline of urobilinoëen veranderen kan. Felix en Moebus ('35) toonden n.l. aan, dat bij aanwezigheid van zuurstof urobilinoëen, dat aan leverbrei werd toegevoegd, na verloop van enigen tijd niet meer werd teruggevonden als urobilinoëen of als urobiline. Daar tegenover staat de oude waarneming van Magnus-Levy ('02), dat bij de autolyse van leverweefsel urobiline ontstaat.

- d. In hoeverre het ontbreken der urobiline-reactie in bepaalde gevallen en in sommige gedeelten van de cel ook inderdaad wijst op de afwezigheid van urobiline of van stercobiline (resp. van de chromogenen) is niet te zeggen. De chromogenen geven de fluorescentiereactie niet dan na oxydatie tot de kleurstoffen. Het is evenwel zeer waarschijnlijk, dat de luchtzuurstof deze oxydatie volledig verricht, daar nooit enig verschil werd waargenomen tussen coupes, die niet, en coupes, die wel met het

oxydatiemiddel bij uitnemendheid voor deze stoffen, het jodium, behandeld werden, ook niet, wanneer het gehalte aan urobilino-geen in de weefsels verhoogd was. Over de stoffen, die de vorming van de urobilinezink-verbinding verhinderen, is weinig meer bekend dan het effect van de toevoeging van sterk zuur aan het reactiemengsel. Dat er in de celdelen, die niet de urobilinezink-fluorescentie vertonen, fluorescentie-uitdovende factoren aanwezig zouden zijn, die de fluorescentie der andere celbestanddelen intact zouden laten en de fluorescentie van de urobilinezink-verbinding selectief zouden uitdoven, is, evenmin als de mogelijkheid, dat het urobiline tijdens de behandeling juist uit die celdelen zou zijn opgelost of verplaatst, uit te sluiten, doch veel minder voor de hand liggend dan de veronderstelling, dat urobiline in die celdelen, ook tijdens het leven, in een te geringe concentratie aanwezig was om nog door onze methode aangetoond te kunnen worden.

Over de betekenis van de op deze wijze met grote zekerheid aangetoonde aanwezigheid en met waarschijnlijkheid gedemonstreerde localisatie van urobiline of stercobiline in normale levercellen zal hier niet gesproken worden, evenmin als over de vraag, of urobiline ook bij andere dieren en in andere organen gevonden kan worden, daar deze vraagstukken buiten het kader van dit onderzoek vallen. De hier gegeven uiteenzettingen over het aantonen van urobiline en stercobiline in weefselcoupes hebben voldoende doen zien, dat met behulp van de microspectrophotometrie van fluorescentielicht stoffen door hun specifieke fysische eigenschappen in weefsels herkend kunnen worden. Zo geven zij de praktische aanvulling van de in de algemene inleiding genoemde theoretische argumenten voor de invoering van deze fysische methode in het histologische onderzoek.



## VI. VERDERE METINGEN, VOORUITZICHTEN.

Bij het urobiline-onderzoek kenden wij het fluorescentiespectrum van één der fluorescerende bestanddelen van de cel en konden door de analyse van de totale fluorescentie dit bekende fluorescentiespectrum in het mengsel van spectra terugvinden. Daarbij beschouwden wij de blauwe fluorescentie der overige celbestanddelen niet nader. Hoe moeilijk een analyse van een dergelijke, in de spectrophotometrische curve niet door duidelijke toppen of dalen gekenmerkte, fluorescentie is, leerden wij bij onderzoekingen over de fluorescentie van de oog lens.

Koch en Fischer ('33) gaven aan, dat de oog lens bij kippen-embryonen niet voor de 6de dag der bebroeding fluoresceert en het leek van belang om het proces van de wording van deze fluorescentie stap voor stap te volgen. Een dergelijk onderzoek zou evenwel slechts waarde hebben, indien het steunde op gegevens over de fluorescentiespectra van de in aanmerking komende bestanddelen van de lens. (Over de aard van de fluorescerende stoffen in de lens is niet veel bekend. Fischer ('34, '40) geeft aan, dat in de lens verschillende fluorescerende bestanddelen voorkomen, waaronder het groen fluorescerende lactoflavine en een hemelsblauw fluorescerende, dialysabele stof, die waarschijnlijk uit aminozuren of nauw daarmee verwante verbindingen bestaat, daar de aminozuur-reacties positief zijn. Bovendien komen in lenzen met cataracta brunescens groen fluorescerende stoffen voor, die hij met de melanoidines van Maillard kon identificeren. Het fluorescentiespectrum van de lens nam le Grand ('38) photographisch op. De door hem gepubliceerde cijfers geven een geleidelijke afname van de relatieve intensiteit van het blauw naar het rood aan. Van belang is, dat de fluorescentiespectra volmaakt aan elkaar gelijk waren, indien zij met monochromatisch ultraviolet licht van uiteenlopende golflengten werden opgewekt. Zoals op blz. 12 werd opgemerkt, pleit dit tegen de aanname dat in het geval van le Grand zeer uiteenlopende stoffen een aandeel in de door hem gemeten fluorescentie hadden.) Aangezien de labiliteit van de fluorescentie van de lens bij de bestraling met  $366 \text{ m}\mu$ , (welke labiliteit zich uit in een vermindering van de fluorescentieintensiteit, gepaard met een verandering in de spectrale samenstelling van het fluorescentielicht) het vermoeden wettigde, dat de lens de fluorescentie, althans voor een deel, ontleende aan de eiwitstoffen (vgl. de door Liesegang en Wels waargenomen veranderlijkheid van de fluorescentie van deze stoffen onder invloed van de ultraviolette bestraling), onderzochten wij de fluorescentie van de bekende eiwitfracties van de lens, die wij bereidden naar de voorschriften van Mörner ('94). Daar de fluorescentiespectra van deze stoffen geen uitgesproken



verschillen met die van de lens zelf vertoonden, gingen wij nog een stap terug en betrokken de aminozuren in ons onderzoek. Het was ons gebleken, dat de fluorescentie-eigenschappen van de gedroogde lens niet duidelijk verschilden van die van de verse en in overeenstemming met deze waarneming besloten wij de aminozuren eveneens droog te onderzoeken. Het bleek, dat er, bij opwekking door 366  $m\mu$ , categorieën van aminozuren te onderscheiden waren met en zonder duidelijke fluorescentie (vgl. Vlès ('36) en dat de duidelijk fluorescerende zich lieten onderverdelen in labiele (bijv. tryptophaan) en stabiele (bijv. tyrosine). In deze eigenschappen, zowel als in de fluorescentiespectra toonden gelijke aminozuren van verschillende herkomst evenwel geen constantheid, zodat met de volgende algemene opmerkingen mag worden volstaan. De fluorescentiespectra der vaste aminozuren vertonen (bij opwekking door 366  $m\mu$ ) over het algemeen geen uitgesproken bijzonderheden: altijd weer het min of meer geleidelijke aflopen van de curve van het blauw naar het rood. Zeer steil liep de curve af bij een monster van tyrosine, bij andere monsters (o.a. die van phenylalanine) liep de curve ongeveer horizontaal en slechts in één geval werd een oplopen van de curve naar de rode zijde waargenomen (l.-4-oxypoline). Te gering voor de meting was de fluorescentie bij de volgende aminozuren: d.-valine, l.-asparaginezuur, l.-glutaminezuur, l.-cystine en histidinehydrochloride. Bij vele van de monsters veranderde de fluorescentieintensiteit tijdens de waarneming; met zekerheid werd slechts *vermindering* waargenomen. In den regel ging deze vermindering gepaard met veranderingen in het fluorescentiespectrum, zonder dat dit spectrum hierdoor meer karakteristiek voor het aminozuur werd. Aangezien de proeven van Wiegand het waarschijnlijk maakten, dat de zuurstof van de lucht van invloed zou kunnen zijn op deze veranderingen namen wij ook spectra op van aminozuren, die zich bevonden in een speciaal daartoe geconstrueerde dunwandige cel, waarin een vacuum kon worden onderhouden. De uitkomsten, die met deze opstelling verkregen werden, waren voor de verschillende monsters van gelijknamige aminozuren ook niet constant; voor een monster van phenylalanine kon evenwel worden aangetoond, dat de aanwezigheid van lucht onder normale druk van invloed was op de verandering in het fluorescentielicht. De fluorescentie-curve van gedroogde lenssubstantie vertoont een dergelijk verloop als die van de meeste aminozuren, de steilheid der curve doet denken aan die van tyrosine- en tryptophaan-monsters, evenals de veranderingen in het fluorescentiespectrum tijdens de bestraling herinneren aan die van tryptophaan.

Wij konden evenwel niet voldoende gegevens in handen krijgen om met enige kans op succes de reeds begonnen metingen aan embryonale ooglenzen weer op te vatten. De onbekendheid met de fluorescentiespectra van de meest elementaire fluorescerende bestanddelen van de lens, de aminozuren, deed het uitzicht van een



onderzoek naar de lensfluorescentie als geheel voorlopig weinig hoopvol schijnen. Als illustratie van de invloed, die de keuze van de lichtbron op de uitslag van deze onderzoeken kan hebben, vermelden wij in dit verband nog slechts, dat bij onze lichtbronnen de fluorescentie van de lens van kippenembryonen ook op de 4de, althans lang voor de 6de, bebroedingsdag, reeds duidelijk waarneembaar is.

Uit het voorbeeld van de onderzoeken over de lensfluorescentie blijkt, hoe belangrijk het is, dat men bij dit soort onderzoeken de fluorescentiespectra van de stoffen waar men naar zoekt goed kent én dat deze spectra binnen het meetbereik iets karakteristieks vertonen. Bij de berekening van de urobiline-curven uit de curven van het gemengde fluorescentielicht bleek bovendien, hoeveel zekerder de uitkomsten zijn, indien er in het spectrum van het gemengde fluorescentielicht gedeelten zijn, die uitsluitend op rekening van een der componenten komen. Dit houdt in, dat in de eerste plaats die stoffen voor onderzoek met deze methode in aanmerking komen, die, spontaan of na een reactie, een fluorescentiespectrum bezitten, waarvan de spectrophotometrische curve op een of meerdere plaatsen binnen het meetbereik de nullijn bereikt, zoals de curve van de urobilinezink-verbinding dat doet bij 450 en 470  $m\mu$ . Alleen in dat geval is de, in het vorige hoofdstuk uiteengezette, eenvoudige berekening van de aandelen der componenten in het gemengde spectrum mogelijk. Indien men deze eisen in het oog houdt, doen zich vele onderwerpen voor, die zich lenen voor dit spectrophotometrische fluorescentie-onderzoek.

Een volledig overzicht van de literatuur op dit punt zal hier niet gegeven worden, want alles over de fluorescentiespectra van biologisch belangrijke stoffen vindt men in de reeds genoemde monographie van Dhéré op overzichtelijke wijze bijeen, terwijl Haitinger in zijn „Fluoreszenzmikroskopie“ de toegang geeft tot de literatuur over deze zijde van het onderwerp. Derhalve zullen hier slechts enkele feiten, die de bijzondere belangstelling verdienen, genoemd worden.

Wat de eigen fluorescentie van weefsels betreft, moeten in de eerste plaats de recente onderzoeken van Hirt en Wimmer ('39, '40) over de fluorescentie van vitaminen vermeld worden. Genoemde auteurs onderzochten de weefsels van met grote vitamine-doses behandelde proefdieren tijdens het leven onder het fluorescentiemicroscop. Ter contrôle vervaardigden zij na afloop van dit onderzoek vriescoupes van de onderzochte organen, welke coupes eveneens onder het fluorescentiemicroscop bekeken werden. Geïnjecteerd werden bij de dieren grote doses van de vitaminen A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C en nicotinezuuramide. Zij vermelden nauwkeurig de localisatie en de kleur van de in het protoplasma der cellen optredende fluorescerende stoffen. Het laat zich aanzien, dat het microspectrophotometrisch onderzoek van de door hen beschreven fluorescentieverschijnselen eerst de directe bewijzen kan leveren



van de door de auteurs geponeerde theoriën omtrent de aard van deze stoffen. De behoefte aan spectrophotometrische controle bij het fluorescentie-onderzoek op vitaminen hebben Querner ('35) en Schairer c.s. ('39) reeds uitgesproken. Zij konden evenwel aan de licht veranderlijke, aan vitamine A toegeschreven, fluorescentie van de „Leuchtstoff X” geen betrouwbare metingen verrichten. Wellicht is dit met een methode als de onze, bij gebruik van de door Jäger ('40) voor deze „Leuchtstoff” aanbevolen bestraling met blauw in plaats van met ultraviolet licht (filters: Jäger ('39) e.a.) mogelijk. Onze eigen waarnemingen aan praeparaten van vitamine B<sub>1</sub>, nicotinezuur, vitamine D en ascorbinezuur in vasten vorm gaven geen spectra met uitgesproken „toppen en dalen” in de curven te zien, die het vermoeden rechtvaardigen, dat deze stoffen in zo lage concentraties herkend zouden kunnen worden als dat voor de urobilinezink-verbinding waarschijnlijk is, doch dit zegt niet, dat de genoemde vitaminen op deze wijze in het geheel niet op te sporen zouden zijn, daar zij plaatselijk in hoge concentraties aangetroffen kunnen worden. In kleine concentraties zullen deze stoffen eerst aan hun eigen fluorescentie herkend kunnen worden wanneer de physica ons meetmethoden heeft geleverd, die in meetbereik, gevoeligheid en nauwkeurigheid de tegenwoordig praktisch te verwezenlijken werkwijzen verre overtreffen. Ook nu bestaat evenwel reeds de mogelijkheid, dat er reacties gevonden worden, die, zoals bij de zinkacetaatreactie op urobiline, deze vitaminen omzetten in stoffen met een duidelijk herkenbare fluorescentie. (Bijv. de thiochroom-methode voor het aantonen en bepalen van vitamine B<sub>1</sub> (Westenbrink en Goudsmit ('37)) en de reactie op een bepaald B<sub>2</sub>-complex (?) met een speciale tryptaflavinesoort van Hirt ('39)).

Hetzelfde geldt voor de door ons in vaste toestand op hun fluorescentie onderzochte zuivere hormonen (progesteron, testosteronpropionaat, oestradiol, oestradiol-3-monobenzoaat, oestron, pregnenolon, desoxycorticosteronacetaat en insuline, ons welwillend voor dit doel afgestaan door de N.V. Organon te Oss). Dhéré vermeldt de onderzoekingen van Bierry en Gouzon over fluorescentiereacties op geslachtshormonen en Haitinger ('40) bericht over een nieuwe fluorescentiereactie op folliculine van Kocsis en Bugyi.

De mogelijkheid moet genoemd worden om de beschreven urobilinereactie om te keren en met urobiline op zink te reageren. Hierop berust de microchemische zink-bepaling volgens Lutz, welke door Burstein ('29) werd aangewend voor het onderzoek naar de verdeling van het zink tussen serum en bloedlichaampjes. Mogelijk leent deze reactie zich ook voor de uitvoering op weefselcoupes. De vraag naar de functie van het zink in het organisme is weer actueel door de vaststelling, dat insulinepraeparaten zink bevatten en door het gebruik van insuline-



praeparaten met geprotraheerde werking als protamine-zink-insuline.

Kreuzwendedich v. d. Borne beschrijft fluorescentie-spectrogrammen van verdunde urine en wijst op de gelijkenis tussen de door hem gevonden curven met die van indoxyl-verbindingen. Een poging, deze stoffen ook in het weefsel aan het fluorescentie-spectrum te herkennen, is zeker gerechtvaardigd.

De bovenstaande opmerkingen gelden het herkennen van stoffen, die onder normale omstandigheden in het organisme voorkomen, aan de eigen of de door een reactie geïnduceerde fluorescentie. Zoals uit het voorbeeld van het urobiline-onderzoek bleek, kan men met de spectrophotometer in het algemeen stoffen met een karakteristiek fluorescentie-spectrum aantonen in concentraties, die zich bij eenvoudige beschouwing nog niet met zekerheid aan de fluorescentiekleur laten herkennen. Hetzelfde geldt voor stoffen, die kunstmatig in het lichaam worden gebracht, zoals dat bij de vitale kleuring geschiedt. Daar sommige stoffen een karakteristiek spectrum paren aan een grote fluorescentieintensiteit, zelfs bij zeer sterke verdunning, lijken deze stoffen aangewezen voor vitale „kleuring” bij concentraties der „kleurstof”, die bij de gebruikelijke methoden nog niet bereikt konden worden. Ellinger en Hirt ('30) beschrijven de waarneming van de excretie van fluoresceïne-Na in nieren van kikkers en merken een verschil op in de tint van de uitgescheiden fluoresceïne in de verschillende delen der niertubuli, welk verschil zij toeschrijven aan verschillen in de zuurgraad van de urine in deze delen van het nephron. Zij geven een tabel in kleurendruk, die de kleuren van het fluorescentielicht van fluoresceïne-Na in bufferoplossingen van verschillende pH weergeeft. Dat deze kleurverschillen eerst recht spectrophotometrisch goed kunnen worden onderzocht en weergegeven spreekt vanzelf. In dit verband is belangrijk het artikel van Spek ('38), waarin hij vermeldt, dat gekleurde indicatoren bij juiste keuze van de kleurstoffen ook gebruikt kunnen worden voor pH-bepalingen in cellen. In tegenstelling met wat men geneigd zou zijn te verwachten behoeft de eiwit- en zoutfout bij deze bepalingen niet groot te zijn. Hij bepaalde de absorptiespectra van de indicatoren in gedeelten van cellen met de microspectrophotometer volgens Engelmann, de visuele waarneming van de kleuren aldus aanvullende met spectrophotometrische data. Een uitgebreid onderzoek naar de bruikbaarheid van fluorescerende indicatoren voor dit doel is, gezien de geringe concentratie waarin deze stoffen reeds een meetbare fluorescentie kunnen geven, zeer gewenst. Een ander geval van het inbrengen van fluorescerende stoffen in het lichaam is dat van de chemotherapie. Vele chemotherapeutica fluoresceren (o.a.: Oesterlin ('36 a)) en een nadere uiteenzetting van het belang ener histologische localisatie van deze stoffen is wel overbodig.

Tenslotte kan men het vraagstuk van de werking van de carcinogene stoffen wellicht iets nader tot de oplossing brengen



door partij te trekken van de specifieke fluorescentiespectra, die vele van deze stoffen eigen zijn (men zie hiervoor Hieger ('30), Sannié ('36) en Maneyord en Roe ('36)). Buitengewoon belangwekkende waarnemingen over de belemmerende werking, die bepaalde stoffen zowel op de fluorescentie als op de carcinogene werking van benzopyreen zouden hebben, beschrijft Oesterlin ('36 b). Hij vond reeds macroscopisch de fluorescentie van benzopyreen terug in een pathologische verhoorning, die bij een zijner proefdieren, als gevolg van de behandeling met deze stof, optrad. Microscopische waarnemingen op dit punt worden vermeld in de fraaie publicatie van Graffi ('40).

## VII. SLOTBESCHOUWING.

In de voorgaande hoofdstukken is een methode beschreven, die, voor het eerst, een kwantitatief, spectrophotometrisch onderzoek aan het eigen fluorescentielicht van onderdelen van cellen in histologische coupes mogelijk maakt. Daarbij zijn de uitkomsten der methode volkomen vergelijkbaar met die van de macroscopische spectrophotometrische bepalingen. De resultaten der metingen worden n.l. uitgedrukt in getallen, die de energieverhoudingen in de verschillende delen van het spectrum weergeven, terwijl daarbij de invloed van de, door de zwakte van het fluorescentielicht noodzakelijk gemaakte, benadering nauwkeurig kan worden opgegeven door de vermelding van de omstandigheden, waaronder de meting geschiedde. De omstandigheden, die beslissend zijn voor de aard van de uitkomsten en die dus in iedere publicatie op dit gebied dienen te worden opgegeven, zijn: de golflengte van het opwekkende licht (in het geval van het urobiline-onderzoek: vooral 366  $m\mu$  en verder, zwak, de banden bij 334 en 313  $m\mu$ , en het, deze golflengten verbindende, continuum) en de verhouding tussen de afmetingen van het collimatorspleetbeeld, die van de oculairspleet en de dispersie van het prisma (in ons geval: collimatorspleetbeeld even breed als de oculairspleet en corresponderend met 20  $m\mu$  dispersie).

Dat bij andere onderzoekingen de keuze op deze punten anders zal kunnen uitvallen, spreekt vanzelf. Bij onderzoek van celonderdelen, die helderder fluoresceren dan de door ons onderzochte, zal men de filtering van het opwekkende licht strenger kunnen maken, de spleetbreedten geringer (en daarmee de zuiverheid van de onderzochte delen van het spectrum groter) en het meetbereik ruimer. Sommige stoffen zullen door de door ons gebruikte golflengte niet tot fluoresceren gebracht kunnen worden of er in korten tijd door vernietigd worden; in dat geval zijn proeven met andere golflengten aangewezen.

Wij kozen het urobiline-onderzoek als paradigma van hetgeen met de methode te bereiken is, omdat het een eigenschap toont, die o.i. elk onderzoek met een dergelijke methode moet kenmerken:



de fluorescentie, die wordt waargenomen, moet worden ontleed aan de hand van bekende fluorescentiespectra. Alleen op deze wijze wordt een spectrophotometrische methode zinvol aangewend. Het is heel goed mogelijk, dat een spectrophotometrische vergelijking van de gele fluorescentie van de argentophiele cellen in de verschillende organen (Erös ('32)) een overeenkomst of een verschil tussen deze cellen waarschijnlijk maakt, doch nader tot de oplossing van de vraag naar het wezen van de geel fluorescerende stof brengt dit onderzoek ons niet. Spectrophotometrisch onderzoek van fluorescentielicht in microscopische praeparaten, dat niet steunt op de kennis der fluorescentiespectra van een of meer van de celbestanddelen, buit de mogelijkheden van deze onderzoeksmethode onvoldoende uit. In het geval van het urobiline-onderzoek was het 't fluorescentiespectrum van de urobilinezink-verbinding, die ons uit de literatuur en uit eigen onderzoek bekend was; een poging om deze fluorescentie in de, verder onbekende, celfluorescentie terug te vinden was dus gerechtvaardigd en de overeenkomst tussen de gevonden en de verwachte curven geeft steun aan de veronderstellingen, die aan de berekening van deze curven ten grondslag liggen. De uitkomsten bewezen, dat wij met deze methode urobiline en stercobiline met grote zekerheid kunnen aantonen en localiseren in normale cellen, daarbij afgaande op een zeer karakteristieke fysieke eigenschap, het emissiespectrum.

Voor zover onze middelen dat toelaten is dus voldaan aan de opgave: het ontwerpen van een microspectrophotometrische methode, geschikt voor onderzoek aan fluorescentielicht en het bewijzen van de bruikbaarheid van de methode door de toepassing ervan op een, praktisch, histologisch vraagstuk.

Zo is dit proefschrift op te vatten als de vrucht van een doelbewust en stelselmatig pogen fysieke methoden dienstbaar te maken aan het Histologisch onderzoek.

## ZUSAMMENFASSUNG.

Im I. Kapittel werden die Fluoreszenzerscheinungen vom physikalischen Standpunkte betrachtet und es wird dargetan, dass die Fluoreszenzanalyse ihre höchste Spezifität erreicht, wenn die spektrale Energieverteilung des ausgesandten Lichtes ermittelt wird.

Zunächst folgt eine Übersicht über die jetzigen fluoreszenzmikroskopischen und mikrospektrophotometrischen Methoden, während im Anfang des IV. Kapitells die erwünschten Eigenschaften eines zu Messungen an der Eigenfluoreszenz dünner Gewebsschnitte geeigneten mikrospektrophotometrischen Instrumentes eingehend und kritisch besprochen werden. Es wird dargelegt, dass für diesen Zweck nur die stärksten Ultraviolettlichtquellen brauchbar sind und dass eine visuelle mikrospektrophotometrische Methode in diesem Falle das Verfahren der Wahl ist. Es wird weiter gezeigt, dass die Reinheit des durch den Okularspalt des Spektroskopen fallenden Lichtes konstant und wohldefiniert gehalten werden kann durch sinngemässe Änderung der Breiten von Okular- und Kollimatorspalten in Übereinstimmung mit der Variation in der Dispersion des Spektroskopenprismas. Wir waren zu diesen Überlegungen genötigt durch die Unmöglichkeit an den schwachen Fluoreszenzlichtern Messungen mit geringen Spaltweiten durchzuführen. In gleicher Weise begründet ist die Wahl des Sukzessivkontrastes als Verfahren zur Vergleichung von Fluoreszenz- und Vergleichslicht. Im letzten Teil dieses Kapitells wird die von uns benutzte Philips S.P. 500 Überhochdruckquecksilberlampe mit Wasserkühlung besprochen, und eine ausführliche Beschreibung gegeben von dem weiteren Aufbau der Apparatur, dem Messungs- und Eichungsverfahren und der Berechnung der Ergebnisse.

Einen Beispiel der Anwendung des Verfahrens auf die Lösung eines histologischen Problems gibt Kapittel V. Es wird eine Methode beschrieben, wobei ganz frische Gewebsschnitte kurz in einer alkoholischen Zinkacetatlösung gebadet und in Paraffinöl eingeschlossen werden, und die Ergebnisse von Messungen an bestimmten Stellen dieser Schnitte werden in Kurvenform mitgeteilt. Aus den Kurven erhellt, dass die an den Blutkapillaren grenzenden Partien in normalen Froschleberzellen urobilinfrei sind, während in den übrigbleibenden Teilen dieser Zellen das spezifische Fluoreszenzspektrum des Schlesingerschen Reaktionsproduktes nachweisbar ist.

Im Kapittel VI werden einige weitere Ergebnisse mitgeteilt und Anregungen über die Anwendungsmöglichkeiten dieses histologischen Verfahrens gegeben.



## GERAADPLEEGDE LITERATUUR:

- Aharoni, J. en Ch. Dhéré: Etude de l'influence exercée par la longueur d'onde des rayons excitateurs sur le spectre de fluorescence de l'étioporphyrine.  
C. R. Acad. Sci. t. 190, p. 1499 (1930).
- Adler, E. en H. v. Euler: Lactoflavin in the eyes of fish.  
Nature (London) vol. 141, p. 790 (1938).
- Bäckström, H. L. J.: Ein Lichtfilter für das mittlere Ultraviolett.  
Naturwiss. Bd. 21, S. 251 (1933).
- Barrenscheen, H. K. en O. Weltmann: Über fluoreszierende Oxydationsprodukte des Bilirubins und deren Bedeutung als Fehlerquelle bei dem üblichen Urobilinnachweis.  
Bioch. Zeitschr. Bd. 140, S. 273 (1923).
- Bayle, E., R. Fabre en H. George: Contribution a l'étude de la fluorescence et ses applications.  
Bull. Soc. Chim. [4] t. 37, p. 89 (1925).
- Bierry, H. en B. Gouzon: Spectres de fluorescence de l'hepatoflavine avant et après irradiation.  
C. R. Acad. Sci. t. 200, p. 2116 (1935).
- Bierry, H. en B. Gouzon: Détection des hormones oestrogènes dans l'urine de la femme enceinte, par une réaction de fluorescence.  
C. R. Soc. Biol. t. 122, p. 147 (1936).
- Bierry, H. en J. Larguier des Blancels: Action de la lumière émise par la lampe à mercure sur les solutions de chlorophylle.  
C. R. Acad. Sci. t. 153, p. 124 (1911).
- Bokkel Huinink, J. W. G. ten: Over de verklaring van de urobilinurie bij haematomen en een nieuw gezichtspunt betreffende het ontstaan van urobilinogeen uit galkleurstof.  
Geneesk. Bladen dl. 38, blz. 178 (1941).
- Borst, M. en H. Königsdörffer: Untersuchungen über Porphyrin.  
S. Hirzel, Leipzig (1929).
- Boutaric, A.: Une nouvelle méthode d'investigation clinique, basée sur la fluorescence.  
Presse Méd. t. 43, p. 817 (1935).
- Brunner, W.: Die klinische Bedeutung der grünen Fluoreszenz im Blutserum.  
Klin. Wochenschr. Bd. 14, S. 121 (1935).
- Burger, G. C. E. en B. H. Stockmann: Over de beoordeling der urobiline-reactie volgens Schlesinger.  
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. dl. 76, blz. 1369 (1932).
- Burstein, A. I.: Die Verteilung des Zinks im Blute des Menschen und der höheren Tiere.  
Bioch. Zeitschr. Bd. 216, S. 449 (1929).
- Caspersson, T.: Über Eiweissstoffe im Chromosomengerüst.  
Naturwiss. Bd. 31/32, S. 514 (1940).
- Cole, P. A. en F. S. Brackett: Absorption spectra of microscopic structures.  
Physic. Rev. [2] vol. 57, p. 1060 (1940).  
(ref. in Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 57, S. 454 (1940)).
- Dankwortt, P. W.: Lumineszenzanalyse im filtrierten ultravioletten Licht. 3 Aufl.  
Akad. Verlagsges., Leipzig (1934).
- Dhéré, Ch.: L'étude spectroscopique et spectrographique des fluorescences biologiques. Sa réalisation pratique. Avantages de la spectrographie.  
Annales de Physiologie t. 8, p. 760 (1932).

- Dhéré, Ch.: Nachweis der biologisch wichtigen Körper durch Fluoreszenz und Fluoreszenzspektren.  
Abderhaldens Hdbch. d. Biol. Arbeitsmeth. II, 3, I, S. 3097 (1934).
- Dhéré, Ch.: La fluorescence en biochimie.  
Les Presses Univ. de France, Paris (1937).
- Dhéré, Ch. en V. Castelli: Sur les propriétés de photoluminescence de la flavine synthétique.  
C. R. Acad. Sci. t. 206, p. 2003 (1938).
- Dhéré, Ch. en J. Roche: Sur la fluorescence et spécialement sur les spectres de fluorescence des pigments du groupe de l'urobilin.  
C. R. Acad. Sci. t. 193, p. 673 (1931).
- Dymschitz, J. en G. Frenckell: Über die Schlesingersche Fluoreszenz in den Venen innerer Organe.  
Pflügers Archiv Bd. 220, S. 623 (1928).
- Ecker, A. en R. Wiedersheim: Anatomie des Frosches. 3. Aufl.  
F. Vieweg u. Sohn, Braunschweig (1896).
- Eisenbrand, J. en G. Siewert: Die Kennzeichnung und Reproduzierbarkeit von Fluoreszenzerscheinungen an festen Stoffen und ihre Verwendbarkeit zu Konzentrationsbestimmungen.  
Arch. der Pharm. Bd. 58, S. 428 (1934).
- Ellinger, P. en A. Hirt: Eine Methode zur Beobachtung lebender Organe mit stärksten Vergrößerungen im Lumineszenzlicht. (Intravitalmikroskopie).  
Abderhaldens Hdbch. d. Biol. Arbeitsmeth. V, 2, II, S. 1753 (1930).
- Elzas, M.: Mededeelingen over de urobilinereactie.  
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. dl. 78, blz. 232 (1932).
- Engelmann, Th. W.: Das Mikrospectrometer.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 5, S. 289 (1888).
- Erös, G.: Eine neue Darstellungsmethode der sogenannten „gelben“ argentaffinen Zellen des Magendarmtraktes.  
Zbl. Path. Bd. 54, S. 385 (1932).
- Euler, H. v., H. Hellström en Z. Adler: Fluoreszenzmikroskopische Studien über das Flavin in Augen.  
Zeitschr. vergl. Physiol. Bd. 21, S. 739 (1935).
- Fabre, R.: Contribution à l'étude de l'application du phénomène de fluorescence en chimie biologique.  
Bull. Soc. Chim. Biol. t. 7, p. 1024 (1925).
- Felix, K. en H. Moebus: Das Verhalten von Urobilinogen in Leber.  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 236, S. 230 (1935).
- Fischer, F. P.: Die fluoreszierenden Substanzen der Linse.  
Arch. Augenheilk. Bd. 108, S. 544 (1934).
- Fischer, F. P.: Gele kleurstoffen van de lens.  
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. dl. 84, blz. 2497 (1940).
- Fischer, H. en E. Adler: Synthese des Mesobilirubinogens usw.  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 200, S. 209 (1931).
- Fischer, H. en H. Halbach: Über die Konstitution des Sterkobilins.  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 238, S. 59 (1935).
- Fischer, H. en F. Meyer-Betz: Zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe, II. Mitt.  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 75, S. 232 (1911).
- Fischer, H. en M. Schubert: Über Tetrapyrrolythane.  
Ber. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 56, S. 2381 (1923).
- Fragstein, K. v.: Ein Christiansenfilter für ultraviolettes Licht.  
Ann. der Physik [5] Bd. 17, S. 28 (1933).
- Fürth, R.: Versuch einer Spektralphotometrie der Farben ultramikroskopischer Einzelteilchen.  
Stz. Ber. Wien. Akad. Wiss. Math.-Naturw. Kl. Ila Bd. 127, S. 119 (1918).



- Goldstein, E.: Über die Untersuchung der Emissionsspektren fester aromatischer Substanzen mit dem Ultravioletfilter.  
Physik. Zeitschr. Bd. 12, S. 614 (1911).
- Gouzon, B.: Production d'urobilin par action des rayons ultraviolets sur la chlorophylle et les porphyrines.  
C. R. Acad. Sci. t. 196, p. 1542 (1933).
- Graffi, A.: Intracelluläre Benzopyrenspeicherung in lebenden Normal- und Tumorzellen.  
Zeitschr. Krebsforsch. Bd. 50, S. 196 (1940).
- Grand, Y. le: Sur la fluorescence du cristallin.  
C. R. Acad. Sci. t. 207, p. 1128 (1938).
- Haas, E.: Recherches nouvelles sur la sensibilité lumineuse différentielle successive pour la lumière blanche.  
C. R. Acad. Sci. t. 182, p. 1176 (1926).
- Haitinger, M.: Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie.  
Akad. Verlagsges. Leipzig (1938).
- Haitinger, M.: Neue Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse auf dem Gebiete der Chemie und verwandter Wissenschaften.  
Angew. Chemie Bd. 53, S. 181 (1940).
- Haitinger, M. en H. Hamperl: Die Anwendung des Fluoreszenz-Mikroskopes zur Untersuchung tierischer Gewebe.  
Zeitschr. Mikr.-Anat. Forsch. Bd. 33, S. 193 (1933).
- Halbach, H.: Über Sterkobilin und Urobilin IX,  $\alpha$ .  
Erg. Inn. Med. Bd. 55, S. 1 (1938).
- Haschek, E. en M. Haitinger: Eine einfache Methode zur Farbestimmung, angewendet auf Fluoreszenzfarben.  
Mikrochemie N. F. Bd. 7, S. 55 (1933).
- Hasskó, A. en P. Lassmann: Einfache Methode zur spektroskopischen Untersuchung der Zelle.  
Arch. Exp. Zellforsch. Bd. 18, S. 219 (1936).
- Heilmeyer, L. en W. Krebs: Über kristallisiertes Urobilin.  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 228, S. 33 (1934).
- Heilmeyer, L. en W. Ohlig: Über Urobilin im Blut.  
Klin. Wochenschr. Bd. 15, S. 1124 (1936).
- Hieger, I.: The spectra of cancer-producing tars and oils and of related substances.  
Bioch. Journ. vol. 24, p. 505 (1930).
- Hirschclaff, E.: Fluorescence and Phosphorescence.  
Methuen's monographs on physical subjects, London (1938).
- Hirt, A. en K. Wimmer: Lumineszenzmikroskopische Beobachtung über das Verhalten von Vitaminen im lebenden Organismus. Das Vitamin B<sub>2</sub> in der Leber.  
Klin. Wochenschr. Bd. 18, S. 733 (1939).
- Hirt, A. en K. Wimmer: Lumineszenzmikroskopische Beobachtungen über das Verhalten von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid im lebenden Organismus.  
Klin. Wochenschr. Bd. 18, S. 765 (1939).
- Hirt, A. en K. Wimmer: Lumineszenzmikroskopischen Untersuchungen am lebenden Tier.  
Klin. Wochenschr. Bd. 19, S. 123 (1940).
- Hodgman, C. D.: Handbook of Chemistry and Physics. 20th ed.  
Chem. Rubber Publishing Co., Cleveland (1935).
- Jäger, R.: referent in: Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 57, S. 187 (1940).
- Jäger, R. en F.: Fluoreszenzmikroskopie im auffallenden Licht.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 56, S. 273 (1939).

- Josephy, B.: A simple fluoroscope, especially for the assay of vitamin B<sub>2</sub>.  
Acta brev. Neerl. dl. 4, blz. 46 (1934).
- Kern, Ch.: Fluoreszenz- und Beugungserscheinungen im Dunkelfeld.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 43, S. 305 (1926).
- Koch, C. en F. P. Fischer: Über das Verlöschen der Fluoreszenz der Linse im kurzwelligigen Lichte.  
Archiv Augenheilk. Bd. 107, S. 440 (1933).
- Kohlrausch, F.: Praktische Physik. 17. Aufl.  
B. G. Teubner, Leipzig-Berlin (1935).
- Kreuzwendedich von dem Borne, G. A.: De blauwe fluorescentie van urine in het ultraviolette licht door indoxylverbindingen.  
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. dl. 82, blz. 1808 (1938).
- Kubowitz, F. en E. Haas: Ausbau der photochemischen Methoden zur Untersuchung des Sauerstoffübertragenden Ferments.  
Bioch. Zeitschr. Bd. 255, S. 247 (1932).
- Lehmann, H.: Das Lumineszenzmikroskop, seine Grundlagen und seine Anwendungen.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 30, S. 417, (1913).
- Lehnartz, E.: Einführung in die chemische Physiologie.  
J. Springer, Berlin (1939).
- Liesegang, R. E.: Zur Ultraviolett-Analyse.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 43, S. 517 (1926).
- Magnus-Levy, A.: Über die Säurebildung bei der Autolyse der Leber.  
Hofmeisters Beiträge Bd. II, S. 261 (1902).
- Maneyord, W. V. en E. Roe: Fluorescencespectrum of 1 : 2-benzpyrene.  
Bioch. Journ. vol. 30, p. 707 (1936).
- Meissner, K. W.: Spektroskopie.  
Sammlung Götschen, W. de Gruyter & Co., Berlin-Leipzig (1935).
- Melczner, N. en T. Venkei-Wlassics: Die Quecksilberhochdrucklampe als Lichtquelle für Fluoreszenzmikroskopie und Mikrophotographie.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 56, S. 211 (1939).
- Metzner, P.: Ein einfaches Fluoreszenzmikroskop.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 45, S. 51 (1928).
- Mörner, C. Th.: Untersuchungen der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges.  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 18, S. 61 (1894).
- Naumann, H. N.: A study on Ehrlich's test for urobilinogen and Schlesinger's reaction for urobilin.  
Bioch. Journ. vol. 30, p. 347 (1936).
- Oesterlin, M.: Deduktive Chemotherapie?  
Klin. Wochenschr. Bd. 15, S. 957 (1936) (a).
- Oesterlin, M.: Chemotherapie, Fluoreszenz und Krebs.  
Klin. Wochenschr. Bd. 15, S. 1719 (1936) (b).
- Perrin, F.: La désactivation induite des molécules et la théorie des antioxygènes.  
C. R. Acad. Sci. t. 184, p. 1121 (1927).
- Perrin, J.: Fluorescence et induction moléculaire par résonance.  
C. R. Acad. Sci. t. 184, p. 1097 (1927).
- Policard, A.: Application de la spectrophotométrie aux recherches de fluoroscopie histologique (microspectrophotométrie).  
Bull. d'Histol. appl. t. 2, p. 317 (1925).
- Policard, A. en A. Leulier: Caractérisation de l'hématoporphyrine et de l'uroline urinaire par la lumière de Wood.  
C. R. Soc. Biol. t. 91, p. 1422 (1924).
- Pringsheim, P.: The fluorescence of organic compounds in solutions.  
Transact. Faraday Soc. vol. 35, p. 28 (1939).



- Pruckner, F. en A. Stern: Über die Absorptionsspektren der Pyrrolfarbstoffe.  
Zeitschr. Physik. Chemie Abt. A. Bd. 180, S. 25 (1937).
- Querner, F.: Der mikroskopische Nachweis von Vitamin A im animalen Gewebe.  
Klin. Wochenschr. Bd. 14, S. 1213 (1935).
- Querner, F. en K. Sturm: Die paraplastischen Fetteinschlüsse der Leberzellen und der Leuchtstoff X.  
Anat. Anz. Bd. 78, S. 289 (1934).
- Royer, M.: Urobiline des organes.  
C. R. Soc. Biol. t. 99, p. 1006 (1929).
- Royer, M.: Physiologie und Klinik des Urobilins.  
Klin. Wochenschr. Bd. 14, S. 347 (1935).
- Sannié, C.: Carcinogenic action and absorption and fluorescence spectra of 1 : 2-benzopyrene.  
Bioch. Journ. vol. 30, p. 704 (1936).
- Schairer, E. c.s.: Beitrag zur Frage des Vitamin-A-Stoffwechsels.  
Virchows Archiv Bd. 305, S. 360 (1939).
- Schlesinger, W.: Zum klinischen Nachweis des Urobilins.  
Dtsch. Med. Wochenschr. Bd. 29, S. 561 (1903).
- Schultz Brauns, O.: Verbesserungen und Erfahrungen bei Anwendung der Methode des Gefrierschneidens unfixierter Gewebe.  
Zbl. Path. Bd. 54, S. 225 (1932).
- Siedel, W.: Synthese des Glaukobilins, sowie über Urobilin und Mesobilivolin.  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 237, S. 8 (1937).
- Siedel, W. en E. Grams: Über Bildung und Konstitution der Mesobilipurpurine usw.  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 267, S. 49 (1940).
- Siedel, W. en E. Meier: Synthese des Urobilins (Urobilin IX,  $\alpha$ ), sowie der isomeren Urobiline -III,  $\alpha$  und -XIII,  $\alpha$ .  
Zeitschr. Physiol. Chemie Bd. 242, S. 101 (1936).
- Singer, E.: A microscope for observation of fluorescence in living tissues.  
Science (N. Y.) vol. 75, p. 289 (1932).
- Sluiter, E.: De stofwisseling der mineralen in het dierlijke organisme. I. Zink.  
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. dl. 74, blz. 5040 (1930).
- Spek, J.: Das pH in der lebenden Zelle.  
Kolloid-Zeitschr. Bd. 85, S. 164 (1938).
- Starkiewicz, J.: Einfluss der Wellenlänge der erregenden Strahlen auf das Fluoreszenzspektrum von viscosen und festen Lösungen.  
Geciteerd naar het Chem. Zbl. 1930, I. S. 1270.
- Steenma, F. A.: Klinische en experimentele onderzoekingen over urobiline en urobilinurie.  
Diss. Amsterdam (1918).
- Terwen, A. J. L.: De quantitative bepaling van urobiline en urobilinoegen in urine en faeces.  
Diss. Amsterdam (1924).
- Tomaschek, R.: Grimsehl's Lehrbuch der Physik, Bd. II, Tl. 2.  
B. G. Teubner, Berlin-Leipzig (1936).
- Vermeulen, D. en J. G. Hagedoorn: Visual intensity measurement with the aid of successive contrast.  
Proc. Kon. Ac. Wetensch. Amsterdam, vol. 39, p. 1089 (1936).
- Vlès, F.: Sur les conditions d'excitation de la fluorescence des protides.  
C. R. Acad. Sci. t. 202, p. 2184 (1936).
- Vlès, F. en M. Gex.: Recherches sur le spectre ultraviolet de l'oeuf d' Oursin.  
Arch. Phys. Biol. t. 4, p. 255 (1928).

- Waelchli, G.: Mikrospektroskopische Untersuchungen der gefärbten Kugeln in der Retina von Vögeln.  
Arch. f. Ophth. Bd. 27, II, S. 305 (1881).
- Watson, C. J.: The origin of natural crystalline urobilin (stercobilin).  
Journ. Biol. Chem. vol. 114, p. 47 (1936).
- Wels, P.: Der Einfluss kurzwelliger Strahlen auf die Fluoreszenz von Eiweisskörpern und ihren Spaltprodukten.  
Pflügers Archiv Bd. 219, S. 738 (1928).
- Wels, P. en M. Jokisch: Der Einfluss der Quarzlampebestrahlung auf die Fluoreszenz von Geweben und Zellen.  
Pflügers Archiv Bd. 223, S. 369 (1929).
- Westenbrink, H. G. K. en J. Goudsmit: Een chemische methode voor de bepaling van het aneurine in urine.  
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. dl. 81, blz. 2632 (1937).
- Wiegand, Chr.: Der Einfluss der Photooxydationsprodukte von Aminosäuren auf die Fluoreszenz von Aminosäuren.  
Pflügers Archiv Bd. 223, S. 378 (1929).
- Wilschke, A.: Über die Fluoreszenz der Chlorophyllkomponenten.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 31, S. 338 (1914).
- Wimmer, K. en A. Hirt: Die Stellung des Reticuloendothels im Vitaminstoffwechsel nach lumineszenzmikroskopischen Beobachtungen am lebenden Tier.  
Anat. Anz. Bd. 88, Erg.-H., S. 42 (1939).
- Wreschner, M.: Lichtquellen für wissenschaftlichen Zwecke.  
Aberhaldens Hdbch. d. Biol. Arbeitsmeth. V, 10, II, S. 1248 (1938).
- Wychem, E.: Über Mikro-Spektrographie.  
Zeitschr. Wiss. Mikr. Bd. 29, S. 339 (1912).
- Zuckerkanndl, F.: Le pouvoir antifluorescent du sérum humain, vis-a-vis de quelques sels de fluorescéine.  
C. R. Soc. Biol. t. 125, p. 804 (1937).



## STELLINGEN

---

### I

Quantitatieve bepalingen, die gegrond zijn op het meten van fluorescentie-intensiteiten en waarbij met het verschijnsel van fluorescentie-uitdoving niet quantitatief rekening gehouden is of kan worden, zijn waardeloos.

### II

De uitkomsten van de onderzoekingen van Karrer en Fritsche geven geen steun aan de theorie van v. Euler c.s. over de functie van het lactoflavine bij het zien in schemerlicht.

(Helv. Chim. Acta 18, 911 ('35))

### III

De fluorescentiereactie van Boutaric c.s. kan over het serum van carcinoomlijders en andere patienten waardevolle inlichtingen geven.

(Presse Méd. 43, 817 ('35))

### IV

De snijtechniek volgens Schultz Brauns biedt ook voor het pathologisch-anatomisch onderzoek tijdens een operatie voordelen.

(Zbl. Path. 54, 225 ('32))

### V

Het is mogelijk, dat men op klinische en microscopisch-anatomische gronden besluit tot de diagnose: ziekte van Déjérine-Sottas, hoewel de verdikking van de zenuwen ontbreekt.

### VI

Het nalaten van het — bij een doelmatig, gereedstaand instrumentarium weinig tijd en moeite eisende — haematologisch onderzoek kan ook in de algemene praktijk een ernstig verzuim zijn.

## VII

Voor de diagnose van lichte gevallen van diabetes dient de glucose-belastingsproef voorafgegaan te worden door een voldoende koolhydraten bevattend dieet.

## VIII

Bij arthritis deformans beproeve men de bestrijding van de pijn met Röntgenstralen.

## IX

Uit histologisch oogpunt is geen bezwaar te maken tegen het gebruik van kunstmatig uit collagene substantie gesponnen chirurgisch hechtmateriaal.

## X

Er is in het medisch opleidingsplan behoefte aan een samenvattende cursus over de sexuele problemen, waarmede de arts in zijn praktijk te maken kan krijgen.

## III

## IV

## V

## VI



## INHOUD.

ALGEMEEN OVERZICHT . . . . .	1
I. INLEIDING . . . . .	3
II. FLUORESCENTIEMICROSCOPIE . . . . .	5
III. MICROSPECTROPHOTOMETRIE . . . . .	8
IV. EIGEN METHODE.	
Inleiding . . . . .	11
Opstelling . . . . .	23
Meting . . . . .	28
Ijking . . . . .	29
Verwerking der uitkomsten . . . . .	31
Meetbereik, gevoeligheid en nauwkeurigheid . . . . .	35
V. HISTOLOGISCH UROBILINE ONDERZOEK.	
Inleiding . . . . .	37
Methode . . . . .	43
Proeven . . . . .	48
Discussie . . . . .	55
VI. VERDERE METINGEN, VOORUITZICHTEN . . . . .	57
VII. SLOTBESCHOUWING . . . . .	62
ZUSAMMENFASSUNG . . . . .	64

---













D  
Ut  
1