

## **Neue Methoden und Systeme der Mikroskop-Photometrie.**

Von

W. O. REUTER und H. WASMUND

Der gegenwärtige Stand der mikroskop-photometrischen Technik und der Möglichkeiten des Einsatzes dieser Untersuchungsmethoden wird hiermit in einer Übersicht aufgezeigt, wobei sich die Beispiele hauptsächlich auf Mikroskop-Photometer der MPV-Reihe (Ernst Leitz, Wetzlar) beziehen, für andere Geräte jedoch ebenfalls Gültigkeit besitzen.

### **Automation der Mikroskop-Photometrie.**

In der einfachsten Version eines Mikroskop-Photometers erfolgt die Bedienung manuell. Manuell betrifft dabei die Bedienung der Mikroskopfunktionen ebenso, wie die Einstellung und Justierung der Elektronik, als auch das Auslösen des eigentlichen Meßvorgangs. Dieses Vorgehen ist vertretbar bei einfachen Plug-Extinktionsmessungen oder bei der Fluorometrie, stößt aber schon hier auf Grenzen und führt vor allem bei der Extinktionsbestimmung zu fehlerhaften Messungen. Der Grund dafür ist die meist inhomogene Verteilung des zu vermessenden Materials in Zelle und Gewebe. Der Ausgleich des Verteilungsfehlers (MENDELSON 1966) wird heute mit Hilfe von Scanningverfahren durchgeführt, bei denen das Objekt mit sehr kleinen Meßfeldern in Schritten von  $0,25\ \mu\text{m}$  oder  $0,5\ \mu\text{m}$  lückenlos in einem mäander- oder kammförmigen Muster abgetastet wird (GOLDSTEIN 1977). Die komplizierte Steuerung der dazu notwendigen optisch-mechanischen Komponenten und die Speicherung und Verarbeitung der riesigen Datenmengen die dabei anfallen, machten den verstärkten Einsatz von Elektronik notwendig.

Die Einführung des Computers brachte die wohl wesentlichsten Neuerungen auf dem Gebiet der klassischen Mikroskop-Photometrie mit sich. Heute sind Tischrechner und Mikroprozessoren, aber auch große Computer selbstverständliches Glied in der Meßkette. Der Rechner kontrolliert alle Mikroskop-Funktionen wie Beleuchtung, Ein- und Ausschalten von bestimmten Strahlengängen; er wechselt die Objektivvergrößerung, justiert in Verbindung mit einer TV-Kamera den Fokus, steuert Scanningtisch und Monochromatoren und speichert und verarbeitet letztendlich die anfallenden Daten.

### Scanning.

Als Ergebnis des absorptions-photometrischen Ab-scannens einer Zelle erhält man, neben den statistischen Daten zu Transmission oder Extinktion, die Fläche des Objekts sowie die Kern-Plasma-Relation in bezug auf Fläche oder optische Dichte. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, den abgescannten Bereich in verschiedener Form graphisch darzustellen. Punktmatrix, Meßwertmatrix, Schnell-ausdruck, Picture Print und 3-D Plot (Abb. 1—3) sind dabei die am häufigsten verwendeten Möglichkeiten. Auch die Verteilung von Extinktion oder Transmission im abgescannten Bereich kann ausgedruckt werden und an diese Information eine weitere Berechnung angeknüpft werden.

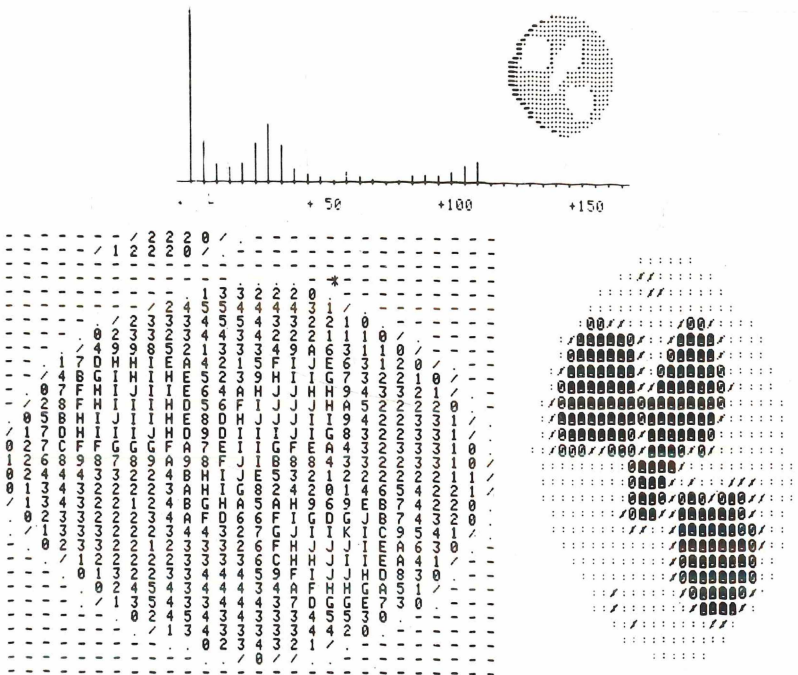


Abb. 1—3: Datenausdrucke auf dem Display eines Rechners. A (oben): Scanning Bild eines Leukocyten als Punktmatrix. Die Meßpunkte im Kern sind zur Unterscheidung vom Cytoplasma nicht dargestellt. B (unten links): Schnellausdruck. Bestimmten Extinktionsbereichen im Objekt sind im Datenausdruck bestimmte alpha-numerische Zeichen zugeordnet. C (unten rechts): Picture Print. Darstellung der Extinktionsverhältnisse in einem Leukocyten als Grauwertbild.

Scanning-Verfahren in der Mikro-Fluorometrie stießen bis heute auf Schwierigkeiten, da man bei Benutzung normaler Lichtquellen und Abtastschritten von  $0,25\ \mu\text{m}$  bis  $0,5\ \mu\text{m}$  nur sehr schwer in der Lage ist, angeregte Fläche im Objekt und Meßfläche genau aufeinander abzustimmen. Dies führt zu Fadingerscheinungen in der Umgebung der Meßstelle und damit zu Verfälschungen des Gesamtergebnisses.

Neu ist ein Verfahren der Fluorometrie, das durch Benutzung des kohärenten Lichts eines Lasers diese Gefahr umgeht und zusätzlich durch die Benutzung eines schnellen Spiegelscanners den Abtastvorgang beschleunigt. Die Abbildung 4 zeigt das Ergebnis eines solchen Laserscans an einer mit Acriflavin-Feulgen gefärbten Zelle von *Tetrahymena pyriformis*. Damit ist wie in der Absorptionsphotometrie die Erfassung des Parameters Fläche ebenfalls möglich.

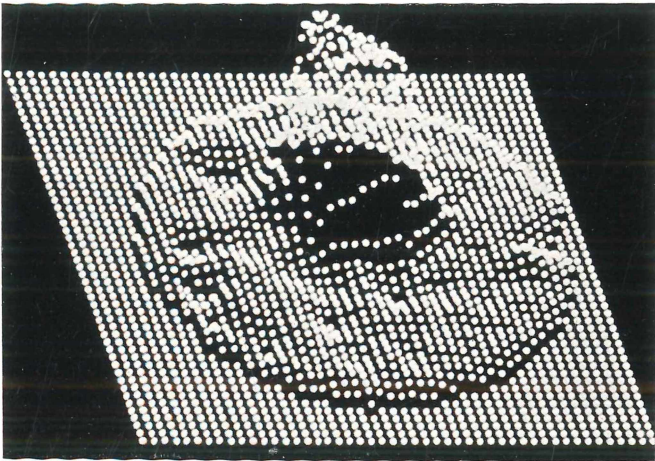


Abb. 4: Laser Scan einer fluorochromierten Zelle. 3-Dimensionale Darstellung der Fluoreszenz-Intensitätsverhältnisse.

#### Kombination von Mikroskop-Photometer und Bildanalysator.

Werden weitere morphometrische Parameter, wie Umfang, Formfaktor, Schwerpunkt und Projektion, zusätzlich zu photometrischen Daten gewünscht, so bietet dazu eine Kombination aus Mikroskop-Photometer (MPV 2), Bildanalysator (ASM) und Prozeßrechner (PDP 8) alle Möglichkeiten (WASMUND 1979) mit einem System. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung an *Tetrahymena*-Zellen ist in Abbildung 5 dargestellt. Eine weitere statistische Bear-

NO	PM	AR	FF	FI
1	101,3	412	16,76	78
2	105,1	432	17,76	84
3	87,3	336	22,93	56
4	176,6	702	27,91	102
5	103,7	383	14,15	63

Abb. 5: Datenausdruck einer Vermessung morphometrischer und photometrischer Parameter mit der Kombination ASM-MPV, PM=Umfang, AR=Fläche, FF=Formfaktor, FI=Fluoreszenzintensität.

beitung der Daten, wie z. B. Korrelations- und Regressionsanalysen, die Darstellung von Verteilungen und Ausführung statistischer Tests, kann mit Hilfe des Rechners durchgeführt werden und gibt in kürzest möglicher Zeit ein vollständiges Bild des Experiments.

Weitere Beispiele zur Automatisierung der Mikroskop-Photometrie kommen aus der Mikrospektralanalyse (PLOEM et al. 1974), Absorption (WASMUND 1976), Fluorometrie (REUTER 1979) und Enzymkinetik (PETTE et al. 1979).

### Durchfluß-Cytophotometrie.

Die wohl in den letzten Jahren faszinierendste Weiterentwicklung der Mikroskop-Photometrie, die Durchfluß-Cytophotometrie oder Flow-Cytometrie, hat auf den ersten Blick mit Mikroskopie und Photometrie nicht mehr all zu viel zu tun. Trotzdem spielt das Objektiv als lichtaufnehmendes System und die Lichtmessung mit Hilfe von Multipliern oder anderen Photoempfängern hier die gleiche Rolle wie in der klassischen Mikroskop-Photometrie, so daß die Flow-Cytometrie durchaus als am Rande der Mikroskop-Photometrie angesiedelt angesehen werden kann.

Das Prinzip der Flow-Cytometrie besteht darin, in einer speziellen Durchflußkammer fluoreschromierte Zellen in flüssigem Medium mit hoher Geschwindigkeit am Ort der Anregung und Vermessung vorbeizuführen. Erste Beschreibungen solcher Kammern stammen von KAMENSKY et al. (1965, 1969), DITTRICH u. GÖHDE (1969), SPRENGER (1971) und GÖHDE (1972). Diese führten zur Entwicklung aufwendiger Systeme mit der Möglichkeit, weitere Parameter neben Fluoreszenz-Intensität zu erfassen und Zellsortierungen durchzuführen (HERZENBERG 1976).

Die Zellsuspension wird im Zentralstrom durch eine Kanüle herangeführt und hydrodynamisch durch Zuführung eines zweiten, partikelfreien Hüllstroms in der Mitte der Kammer stark eingeengt. Diese hydrodynamische Fokussierung führt zur Vereinzelung der Zellen und stabiler Ortslage des Zentralstroms. An einem definierten Punkt optimaler Fokussierung erfolgt die Anregung der fluoreschromierten Objekte mit Laserlicht oder energiereichen Hochdrucklampen und die Vermessung des so erzeugten Fluoreszenzblitzes. Die photometrischen Signale werden nach geeigneter elektronischer Vorverarbeitung einem Impulshöhen-Analysator zugeführt und nach ihrer Amplitude klassiert. Die Signalamplitude, d. h. die Intensität des Fluoreszenzblitzes, ist bei entsprechender quantitativer Fluoreschromierung der Menge der fluoreszierenden Substanz proportional. Es gelten dabei die gleichen Bedingungen wie für die klassische Mikro-Fluorometrie.

Als Ergebnis einer solchen Analyse lassen sich z. B. 30 000 bis 40 000 Zellen in 10—15 Minuten verarbeiten und ergeben ein typisches Verteilungsmuster (GÖHDE 1972). Bei der Bestimmung der DNS-Mengen von proliferierenden Zellen zeigt sich zum Beispiel die Zellzyklus-Phasenverteilung der Zellen als deutliches Muster im

Histogramm. G1 und G2-Peak sind klar voneinander zu trennen. Nach bestimmten mathematischen Operationen (DEAN u. JETT 1974) wird es möglich, die prozentualen Anteile der drei Zellzyklus-Phasen G1, S und G2 an der Gesamtpopulation zu berechnen.

Vor allem diese Möglichkeit der Berechnung der Phasenanteile bestimmt den hauptsächlichlichen Einsatz der Flow-Cytometry in zellkinetischen und populationsdynamischen Studien sowie in der klinischen Forschung und Praxis zur Früh-Erkennung von Tumoren und Therapiekontrolle nach Zytostatikagabe (ANDREEFF 1975 a, b, GÖHDE et al. 1976).

Der hohe Bedienungsaufwand und die Kosten der Flow-Systeme haben es bis heute verhindert, daß dieses Verfahren eine ähnlich weite Verbreitung gefunden hat wie die Mikroskop-Photometrie selbst. Dies führte zu Experimenten unter Verwendung nur leicht modifizierter Mikroskop-Fluorometer und spezieller adaptierbarer Durchflußkammern. Heute ist es möglich, mit Hilfe normaler Fluoreszenz-Mikrophotometer und Kammeranordnungen nach STEEN u. LINDMO (1979) oder THAER (1979), Ergebnisse wie mit großen Flow-Systemen zu erhalten. Zusätzlich sind mit dem gleichen Instrument alle normalen mikroskop-photometrischen Messungen möglich.

#### Ausblick.

Die Mikroskop-Photometrie, als Teilgebiet der quantitativen Mikroskopie, ist heute durch den Einsatz von Rechnern weitgehend automatisiert. Sie bedarf aber immer noch der ständigen Kontrolle und Leitung durch den Benutzer. Für vollautomatischen Einsatz, vor allem in Anwendungsbereichen außerhalb der Biologie, in der klinischen Routine, in Fragen der Werkstoffuntersuchung und Qualitätskontrolle in der Industrie, muß der Automatisationsgrad weiter erhöht werden. Neben der Einführung von Mikroprozessoren zur Verbesserung der Steuermöglichkeiten wird jedoch in Zukunft auch der Einsatz von Lasern als Lichtquellen, Autofocus-Systemen, elektronischem Lichtabgleich und die Erweiterung des Spektrums möglicher Photoempfänger das Gesicht der Mikroskop-Photometrie weiter verändern. Den Kombinationsmöglichkeiten mit bildanalytischen Verfahren, vor allem die Erhöhung der Flexibilität im Austausch von Bildinformationen aus Mikroskop-Photometer und Bildanalysator wird weitere Bedeutung zukommen, und die Entwicklung von Spezialgebieten mit mikroskop-photometrischer Grundlage wie Flow-Cytometry oder Mikrogeschwindigkeitsmessung mit Hilfe optischer Korrelatoren wird nicht stehenbleiben.

#### Summary.

##### **New Methods and Instrumentation in Micro-Photometry.**

Microphotometric instruments have changed rapidly during the last decade, depending on introduction of computers in micro-

photometric systems. This short review describes facilities of using computers for control of microphotometric measurements and data evaluation. Different computer prints of cells scanned with a mechanical stage or laser-mirror-scanner and components of a combination of microphotometer and image analysing system are described. As example of the development of new methods based on microphotometry, the principle of flow cytometry is explained, and recent experiments with special flow chambers for adaption to normal microfluorometers are shortly discussed.

### Literaturverzeichnis.

- ANDREEFF, M.: Die Zellkinetik der spontanen und der durch Chemo- und Radiotherapie modifizierten Progression von Transplantationstumoren. Habilitationsschrift. Heidelberg 1975 a.  
 — (ed.): Impulscytophotometrie. Berlin, Heidelberg, New York (Springer Verlag) 1975 b.
- DITTRICH, W., GÖHDE, W.: Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspension. Z. Naturforschg. 24:360, 1969.
- GÖHDE, W.: Automation in der quantitativen Zytologie mit dem Impulscytophotometer. GBK-Mitteilungen 6:255—276, 1972.
- , SCHUMANN, J., BÜCHNER, T. H. (ed.): Pulse cytophotometry. Ghent (European Press) 1976.
- GOLDSTEIN, D. J.: Integrating microdensitometry. In: Analytical and quantitative methods in microscopy. Cambridge University Press 1977.
- KAMENSKY, L. A., MELAMED, M. R., DERMAN, H.: Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis. Science 150:630, 1965.
- , —: Instrumentation for automated examination of cellular specimens. Proc. IEEE 57:2007, 1969.
- MENDELSON, M. L.: Absorption cytophotometry. In: Introduction to quantitative cytochemistry. New York, London (Academic Press) 1966.
- PETTE, D., WASMUND, H., WIMMER, M.: Principle and method of kinetic microphotometric enzyme activity determination in situ. Histochemistry, im Druck 1979.
- PLOEM, J. S., DE STARKE, J. A., BONNET, J., WASMUND, H.: A microspectrofluorimeter with epi-illumination operated under computer control. J. Histochem. Cytochem. 22: 668—677, 1974.
- REUTER, W. O.: Mikrofluorometrie-Automatisierung einer Methode. Microscopica Acta Suppl. im Druck 1979.
- STEEN, H. B., LINDMO, T.: Flow cytometry: A high resolution instrument for everyone. Science 204:403—404, 1979.
- THAER, A.: persönliche Mitteilung 1979.
- WASMUND, H.: Computergesteuertes Scanning-Mikroskop für die Analyse von Einzelzellen. Leitz Mitt. Wiss. u. Techn. VI: 217—223, 1976.
- : Ein System zur simultanen Messung morphometrischer und mikroskopphotometrischer Größen. Leitz Mitt. Wiss. u. Techn. VII: 190—192, 1979.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Bericht der Oberhessischen Gesellschaft für Natur- und Heilkunde](#)

Jahr/Year: 1979-80

Band/Volume: [45\\_1980](#)

Autor(en)/Author(s): Reuter W. O., Wasmund H.

Artikel/Article: [Neue Methoden und Systeme der Mikroskop-Photometrie. 101-106](#)