

DIE METHODEN DER FLUORESZENZ- MIKROSKOPIE

Von PROF. DR. HERWIG HAMPERL

(Direktor der Bakteriologisch-Serologischen Untersuchungsanstalt
und Prosektur an den Landeskrankenanstalten Salzburg)

Im letzten Jahrzehnt hat sich die Fluoreszenzmikroskopie als teils willkommene, teils geradezu notwendige Ergänzung der üblichen Lichtmikroskopie ihren Platz in Laboratorium erobert. Viel hat dazu auch die ständige Verbesserung des Fluoreszenzmikroskopes beigetragen, die ich selbst während meiner 15jährigen Beschäftigung mit diesem Verfahren mitmachen konnte. Die heute zur Verfügung stehenden Modelle, wie insbesondere die letzte REICHERT'sche Fluoreszenzeinrichtung, erfüllen alle Ansprüche, die man billigerweise an einfache Handhabung und Lichtstärke stellen kann. Bei diesem Stande der Dinge scheint es mir angezeigt, einen kurzen Überblick über die erprobten Verfahren zu geben, um Fehlschläge und Enttäuschungen so weit als möglich zu verhindern.

Jeder, der von der gewöhnlichen Lichtmikroskopie herkommt, muß, wenn er sich mit der Fluoreszenzmikroskopie beschäftigt, mit einer Eigentümlichkeit des Verfahrens rechnen, nämlich mit seiner besonderen *E m p f i n d l i c h k e i t*. Sie ist ein Vorteil insoferne, als es dadurch möglich wird, Dinge zu beobachten, die uns sonst entgehen; sie ist aber auch — wenn man so will — ein Nachteil, denn schon kleinste Abweichungen im Untersuchungs-gang, feinste Verschmutzungen oder nicht ganz reine Reagentien können das Fluoreszenzbild trüben und verändern. Alle Schwierigkeiten der Fluoreszenzmikroskopie bestehen im Grunde eigentlich nur darin, diese Unzu-kömmlichkeiten zu vermeiden. In den folgenden Ausführungen zu diesem Gegenstand möchte ich mich bewußt auf die Untersuchungen toten Gewebes beschränken, die am ehesten mit denen der üblichen Lichtmikroskopie zu vergleichen sind und lasse die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungsverfahren am lebenden Gewebe, wie sie vor allem HIRT und ELLINGER gepflegt haben, außer Betracht.

Grundlage aller Feststellungen über veränderte Fluoreszenz eines Gewebes muß natürlich die Kenntnis seiner normalen Fluoreszenz sein. Um zu einem Urteil über diese zu gelangen, ist es notwendig, Schnitte von einem Material zu untersuchen, das durch keine oder möglichst wenige Eingriffe verändert wurde. Diese Bedingungen sind eigentlich nur bei *G e f r i e r s c h n i t t e n v o n u n f i x i e r t e m G e w e b e* gegeben, die man ja heute mit dem Messertiefkühlverfahren von so gut wie allen Organen gewinnen kann. Als neutrales Einschlußmittel kommt dabei vor allem physiologische Kochsalzlösung in Frage (FAHR).

Selbstverständlich ist es auch in der Fluoreszenzmikroskopie vorteilhaft, ja für gewisse Gewebsbestandteile, deren Hinfälligkeit uns bekannt ist, auch notwendig, die *G e w e b e f r i s c h* zu untersuchen. Im allgemeinen kann

man aber sagen, daß durch kadaveröse Veränderungen, wenn sie nicht sehr weit fortgeschritten sind, keine neuen Fluoreszenzen geweckt, wohl aber gewisse Fluoreszenzen vermindert oder gar ausgelöscht werden, wie z. B. die ein bis drei Stunden nach dem Tode verschwindende Fluoreszenz mancher Nierenkanälchen (FAHR). Erst bei beginnender Fäulnis tritt eine weißliche oder rötliche Fluoreszenz auf. Die rötliche Fluoreszenz geht offenbar auf die Anwesenheit von Porphyrin in irgendeiner Form zurück, da uns sonst keine natürliche rotfluoreszierende Substanz im Organismus bekannt ist. Es entsteht beim Zerfall von roten Blutkörperchen unter Einfluß von fäulnis-erregenden Mikroorganismen. V. BALOGH hat zeigen können, daß vor allem der FRÄNKEL-WELCH-Bazillus und Bacterium coli diese Fähigkeit haben. Daher ist es begreiflich, wenn jene rötliche Fluoreszenz unter Umständen auch schon makroskopisch in faulig zerfallendem Gewebe sichtbar wird. Die weißliche Fluoreszenz führt FAHR auf eine Gerinnung des Eiweißes zurück und kann darauf hinweisen, daß auch nach Einwirkung von Fixierungsmitteln, die ja Eiweißfällungsmittel darstellen, solche weißliche Fluoreszenz in den Geweben auftritt (HAMPERL [1, 2]). Übrigens ist sie in ähnlicher Weise auch am eingetrockneten Gewebe sichtbar.

Auf Grund dieser Kenntnisse wird man das Fluoreszenzbild des fixierten Gewebes vorsichtiger und richtiger beurteilen. Als Fixierungsmittel, das die Fluoreszenz am wenigsten ändert, hat sich allen Untersuchern das gewöhnliche reine Formol am besten bewährt, ermöglicht es doch, sowohl Gefrier- wie Paraffinschnitte nach Belieben herzustellen. Man wird nur immer bedenken müssen, daß die Gewebe durch die mit der Fixierung verbundene Eiweißfällung eine leichte, eher diffuse blasse Fluoreszenz erhalten, wobei auch die natürliche Fluoreszenz, z. B. der kollagenen und elastischen Fasern, verstärkt wird. Im ganzen gesehen wird das Fluoreszenzbild aber nicht grundsätzlich beeinträchtigt oder abgeändert. Dies trifft freilich nur für einen nicht zu langen Aufenthalt des Gewebes in Formalin zu. Monate- oder jahrelange Aufbewahrung von Geweben in Formalin führt zu Veränderungen der Fluoreszenz, die in ihren Einzelheiten kaum mehr überblickbar sind. Ich habe z. B. darauf hingewiesen, daß an solchem Material die sonst nicht fluoreszierenden roten Blutkörperchen zu leuchten beginnen und Neutralfett eine eigentümliche gelbopake Fluoreszenz annehmen kann; schließlich können fast alle Gewebe eine grünlich-bläuliche Fluoreszenz zeigen.

Die übliche Paraffineinbettung ändert, wenn sie mit reinen Reagentien vorgenommen wird, nichts mehr an der durch die Formolfixierung festgelegten Fluoreszenz der Gewebe, abgesehen davon, daß natürlich mit der Extraktion der Fettstoffe auch die an diese gebundenen Fluoreszenzen verschwinden. Einbettung in Gelatine oder Celloidin kommt wegen der starken Eigenfluoreszenz dieser Stoffe nicht in Betracht.

Als Einschlußmittel für entparaffinierte Schnitte und Gefrierschnitte dienen Wasser, physiologische Kochsalzlösung und fluoreszenzfreies Paraffinöl, alles Flüssigkeiten, die vor dem Austrocknen durch Umranden der Deckgläschen geschützt werden müssen. Dazu verwendet man am besten

Paraffin oder sog. venetianischen Lack, nicht aber Kitt, aus dem leicht fluoreszierende Stoffe in Lösung gehen. Das sonst sehr brauchbare und aufhellende Glycerin kann allerdings mitunter die ursprüngliche Fluoreszenz verstärken, was gelegentlich störend, gelegentlich aber als eher erwünscht empfunden wird.

Da die Objektträger nicht immer aus reinem Glas bestehen, tut man gut, sie vor Gebrauch im UV-Licht darauf zu prüfen, ob sie nicht selbst fluoreszieren, was natürlich die Reinheit des Gewebsbildes beeinträchtigen würde. Meist genügen die gewöhnlichen käuflichen Objektträger, falls sie nur aus besserem Glas bestehen.

Bei Benützung der stärkeren Objektive ist man manchmal dadurch behindert, daß kleinere helleuchtende Gebilde von einer Art Lichthof umgeben sind und so nicht scharf genug konturiert erscheinen. Die optische Industrie hat diesem Mangel durch den Einbau von Irisblenden in solche Objektive abgeholfen. Es ist klar, daß bei Anwendung von Immersionsobjektiven nur fluoreszenzfreies Immersionsöl oder Paraffinöl benutzt werden kann.

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich uns zum Nachweis besonderer Stoffe und ihrer Lage in den Geweben gut bewährt. Der kanzerogene Stoff Benzpyren wird z. B. durch Formolfixierung in seiner Lage und Fluoreszenz nicht verändert (GÜNTHER), so daß seine Auffindung in gewöhnlichen Gefrierschnitten von formolfixiertem Material leicht möglich ist (HAMPERL [3]). Benzpyren zeigt außerdem, je nachdem, ob es gelöst oder in kristallinischer Form vorhanden ist, eine blauviolette oder grünliche Fluoreszenz.

Übrigens habe ich jüngst feststellen können, daß Benzpyren auch als „Farbstoff“ an Gefrierschnitten von formolfixiertem Material mit Erfolg verwendet werden kann. Eine 70—90%ige alkoholische Benzpyrenlösung, in der nur Bruchteile von Milligrammen dieses Stoffes vorhanden sind, verleiht trotzdem nach wenigen Sekunden dem Neutralfett eine hell-weißblaue Fluoreszenz, während die Markcheiden der Nervenfasern hellblau aufleuchten.

Zum Unterschied von Benzpyren, zu dessen fluoreszenzmikroskopischem Nachweis keine besonderen Verfahren nötig sind, erfordert die Untersuchung auf das Vorhandensein des Vitamins A bzw. des ihm nahestehenden Leuchtstoffes (v. QUERNER) besondere Vorsichtsmaßregeln. Die Fluoreszenz dieses Stoffes nimmt nämlich unter dem Einfluß nicht bloß der UV-Strahlen im Mikroskop, sondern auch schon im Tageslicht sehr rasch ab, so daß die Herstellung der Gefrierschnitte von unfixiertem Material bei Ausschluß des Tageslichtes vor sich gehen muß (SACHS [1]).

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung braucht sich aber nicht auf die Feststellung der in den Geweben natürlich vorhandenen Fluoreszenzen zu beschränken; man kann vielmehr auch neue Fluoreszenzen hervorrufen oder bestehende in kennzeichnender Weise abändern. Grundsätzlich stehen uns hierfür zwei Wege zur Verfügung:

1. Die Behandlung der Gewebsschnitte mit nichtfluoreszierenden Stoffen, eine Forschungsrichtung, die meines

Erachtens noch lange nicht ausgeschöpft ist. Als Beispiel möchte ich nur erwähnen, daß es SACHS (2) gelang, durch Behandlung von Gewebsschnitten mit Wasserstoffsperoxyd, d. h. durch Oxydation, an gewissen Pigmenten des Zentralnervensystems die für Lipofuszin kennzeichnende gelbe Fluoreszenz hervorzurufen und sie damit vom Melanin zu unterscheiden, dem sie sonst in jeder Beziehung gleichen und bisher auch zugeordnet wurden. BOMMER hat nach Anwendung von Kalilauge das Auftreten von gelblich fluoreszierenden Körnchen im Herzmuskel beobachtet, deren Bedeutung und Entstehung noch nicht geklärt ist.

Als zweite Möglichkeit kommt die Behandlung der Schnitte mit Stoffen in Frage, die selbst fluoreszieren und ihre Fluoreszenz gewissen Gewebsbestandteilen mitteilen, ähnlich wie dies bei der Färbung mit den üblichen Farbstoffen in der Histologie geschieht. Ich (1) habe seinerzeit eine ganze Reihe solcher Stoffe auf ihre Eignung für den fluoreszenzmikroskopischen Färbvorgang geprüft. HAITINGER hat sie dann als Fluorochrome bezeichnet. Die Besprechung ihrer Anwendung ginge allerdings über den Rahmen dieser Mitteilung hinaus.

Literatur

- | | |
|--|---|
| <p><i>Balogh E.</i>, Verh. Dtsch. path. Ges. 30 (1937): 322.</p> <p><i>Bommer S.</i>, Dermatol. Wschr. 82 (1926): 637.</p> <p><i>Fahr E.</i>, Frankf. Z. Path. 57 (1943): 533.</p> <p><i>Günther W.</i>, Z. Krebsf. 52 (1941): 57.</p> | <p>1. <i>Hamperl H.</i>, Z. mikroskop.-anatom. Forschung 33 (1933): 199.</p> <p>2. — VIRCHOWs Arch. 292 (1934): 1.</p> <p>3. — <i>Graffi und Langer</i>, Z. Krebsf. 53 (1942): 133.</p> <p>1. <i>Sachs H. W.</i> VIRCHOWs Arch. 309 (1942): 70.</p> <p>2. — ZIEGLERs Beitr. 1944.</p> |
|--|---|

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1947

Band/Volume: [2](#)

Autor(en)/Author(s): Hamperl Herwig

Artikel/Article: [Die Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. 152-155](#)