

BEITRÄGE ZUR PHASENKONTRAST-MIKROSKOPIE

I. MITTEILUNG: PRAKTISCHE METHODIK UND KRITISCHE BETRACHTUNGEN

Von HELMUT HASELMANN

Mit 10 Abbildungen

Die vorliegende Arbeit ist, von kleinen Änderungen abgesehen, schon seit etwa $1\frac{1}{2}$ Jahren fertiggestellt. Durch zeitbedingte Umstände wurde die Veröffentlichung jedoch bis heute verzögert. Der theoretische Teil dieser Mitteilung wurde herausgenommen, nachdem bereits in Heft 3/4 dieser Zeitschrift ein ausführlicher Beitrag von KEUNING über die Theorie des Phasenkontrast- (Ph.-K.-) Verfahrens in der Mikroskopie erschienen ist. Es kommen daher hier nur die Probleme zur Sprache, die bei der praktischen Anwendung des Ph.-K.-Verfahrens in methodischer und erkenntniskritischer Hinsicht an den Untersucher herantreten.

Apparatur

Bei meinen phasenmikroskopischen Arbeiten, die im Jahre 1945 begonnen wurden, kam die Ph.-K.-Einrichtung von Carl Zeiß, Jena, und später die von Zeiß-Winkel, Göttingen, zur Anwendung. Die Einrichtung von Zeiß, Jena, wurde neben der normalen Ausführung mit Kondensor-Revolverscheibe auch in Verbindung mit dem Lumipan-Stativ benützt. Letztere Anordnung bringt für den praktischen Gebrauch insofern Vorteile mit sich, als der pankratische Kondensor es gestattet, die Ringblende in der Austrittspupille des Objektivs in jeder erforderlichen Größe abzubilden, und so ein Wechsel dieser Blende beim Objektivwechsel und damit der Blendenrevolver überflüssig ist. Zudem kann bei Präparaten mit großer Objektiefe (Flüssigkeitskammer für lebende Objekte) der pankratische Kondensor als Brillenglaskondensor verwandt und somit eine große Schnittweite des Kondensors erreicht werden. Bei dieser Anordnung wirkte es sich jedoch ungünstig aus, daß bei dem Lumipan-Stativ älterer Ausführung, das mir zur Verfügung stand, die eingebaute Lichtquelle bei Ph.-K.-Untersuchungen mit stärkeren Objektiven und bei strenger Lichtfilterung in ihrer Leuchtdichte nicht ausreichte. Die neuere Einrichtung von Zeiß-Winkel, die ich jetzt fast ausschließlich verwende, stellt in mehrfacher Hinsicht eine Verbesserung dar. Die Apertur des zu ihr gehörenden Kondensors ist bereits so niedrig gewählt, wie es die stärksten Objektive zulassen. Für die Zentrierung der Ringblenden am Revolver wurde ein neues Prinzip entwickelt, das auf der Kombination einer Drehung der Revolverscheibe und der Bedienung eines Exzenterhebels beruht. Diese Anordnung erscheint mir wesentlich günstiger und angenehmer zu bedienen als die mit zwei Schrauben, wie man sie auch von der Objektisch-Zentrierung her kennt. Der normale Objektivsatz dieser Einrichtung umfaßt drei achromatische Objektive, und zwar Ph 10 num. Apertur 0,25, Ph 40 num. Apertur 0,65 und Ph 100 num. Apertur 1,30. Die beiden stärkeren Objektive werden neuerdings mit einem Präparatschutz versehen, der darauf beruht, daß das eigentliche Objektiv federnd in der Fassungshülse angeordnet ist. Gerade bei der Untersuchung von ungefärbten, schwer auffindbaren Objekten ist diese Einrichtung sehr wertvoll. Zusätzlich zu dieser serienmäßigen Ausrüstung verwende ich noch ein apochromatisches Immersionsobjektiv mit der Eigenvergrößerung 60 und der numerischen Apertur 1,40⁴⁾. Die Vorteile dieses Objektivs sind so groß, daß ich es heute für meine Untersuchungen fast ausschließlich benütze. Die niedrige Eigenvergrößerung in Verbindung mit der hohen Apertur ermöglicht es, lediglich durch Okularwechsel oder, bei der Mikrophotographie, durch Veränderung des Bildabstandes, den praktisch ausnützbaren Vergrößerungsbereich zu erfassen. Nur zur orientierenden Einstellung und Beobachtung dient mir das schwache Trockensystem gleichsam als Sucherobjektiv. Gerade bei der Ph.-K.-Mikroskopie ist es so angenehm, das Objektiv nicht wechseln und das einmal

⁴⁾ Die Anfertigung eines derartigen Objektivs verdanke ich der lebenswürdigen Vermittlung von Herrn Dr. K. MICHEL, dem ich auch für sonstige weitestgehende Unterstützung und wertvolle Ratschläge zu großem Dank verpflichtet bin.

aufgebrachte Immersionsöl nicht mehr entfernen zu müssen. Bei umrandeten Präparaten von lebenden Objekten ist es sogar so gut wie unmöglich, das Deckglas wieder so einwandfrei vom Immersionsöl zu reinigen, wie es die Empfindlichkeit der Methode erfordert. Es wäre daher meines Erachtens sehr zu begrüßen, wenn sich die optische Industrie dazu entschließen könnte, serienmäßig Ph.-K.-Objektive mit hoher Apertur und niedriger Eigenvergrößerung herzustellen.

Leider hatte ich bis jetzt noch keine Gelegenheit, Objektive mit verschiedenen Werten der Phasenplatten zu benützen. Ich habe jedoch, zumindest soweit es sich um den Bereich der Untersuchung menschlicher und tierischer Gewebe handelt, aus erkenntnistheoretischen Erwägungen heraus gewisse Bedenken gegen eine solche Mannigfaltigkeit in der Untersuchungsanordnung. In einer späteren Arbeit soll auf diese Frage noch näher eingegangen werden.

Beleuchtung

Für den beleuchtenden Strahlengang beim Ph.-K.-Mikroskop ist auf eine strenge Einhaltung des Köhlerschen Prinzips unbedingt zu achten. In fast sämtlichen Fällen, in denen ich wegen Mißerfolgen mit dem Ph.-K.-Verfahren zu Rate gezogen wurde, stellte sich heraus, daß bei der Beleuchtung Fehler gemacht worden waren. Die Lichtquelle muß eine ausreichende Leuchtdichte besitzen und annähernd homogen sein. Das trifft ohne besondere Maßnahmen für die Bogenlampe wie auch für die Punktlichtlampe (Metallbogenlampe in einem Glaskolben) zu. Wird eine Glühlampe (Niedervoltlampe) verwendet, so muß entweder ihr Glaskolben mattiert sein oder eine feinkörnige Mattscheibe vorgeschaltet werden, um eine gleichmäßige Ausleuchtung zu erreichen. Vor der Kollektroptik der Lichtquelle ist eine Irisblende als Leuchtfeldblende erforderlich. Das Bild dieser Leuchtfeldblende wird durch Höhenverstellung des Kondensors im Objekt scharf abgebildet. Dabei ist zu beachten, daß diese Blende genügend weit geöffnet wird. Man kann sich davon durch Einschieben des Hilfsmikroskops in den Tubus überzeugen. Die farbigen Beugungserscheinungen, die vom Rande dieser Blende herrühren, dürfen in der Austrittspupille des Objektivs nicht bis in den Bereich der Phasenplatte hineinreichen. Die so ermittelte Öffnung der Leuchtfeldblende ist meist größer als bei der Hellfeldmikroskopie. Auch die spektrale Zusammensetzung der beleuchtenden Strahlen ist wichtiger als bei der Hellfeldmikroskopie. Theoretisch wäre sogar streng monochromatisches Licht erforderlich, um einen einwandfreien Kontrasteffekt zu erreichen. In der Praxis sind die Bedingungen zwar nicht ganz so kritisch, es empfiehlt sich jedoch, schon bei der subjektiven Beobachtung mit einem Grünfilter, z. B. dem Zeißschen Trichromfilter, zu arbeiten. Bei der Ph.-K.-Mikrophotographie ist eine strenge Lichtfilterung sogar unbedingt notwendig, nicht zuletzt schon deshalb, weil bis jetzt praktisch alle Ph.-K.-Objektive Achromate sind. Für kritische Untersuchungen ist die Anwendung eines Interferenz-Monochromatfilters mit seinen günstigen Eigenschaften mindestens des Versuches wert. Da die als Kondensoraperturblende wirkende Ringblende eine wesentlich kleinere durchlässige Fläche besitzt als die normale Irisblende der gleichen Apertur, ist auch die Lichtausbeute geringer, und so liegen die erforderlichen Belichtungszeiten beim Ph.-K. wesentlich höher als bei der Hellfeld-Mikrophotographie. Sie betragen nach meinen Erfahrungen, je nach dem benützten Objektiv, das 3- bis 15fache des Wertes bei der Hellfeldaufnahme. Auch hieraus ergibt sich die Notwendigkeit einer Lichtquelle mit ausreichender Leuchtdichte, ganz besonders für die Zwecke einer eventuellen Ph.-K.-Mikrokinematographie.

Das Untersuchungsobjekt

In den meisten Darstellungen oder Gebrauchsanweisungen wird als die wichtigste Forderung an das Objekt die möglichst geringe Schichtdicke angegeben. Genauer formuliert müßte man sagen: der durch das Objekt durchfallende Strahlengang soll möglichst wenige in seiner Verlaufsrichtung hintereinander angeordnete beugende Grenzen von Strukturelementen passieren müssen. Sonst stören die von verschiedenen Objektebenen ausgehenden Beugungserscheinungen die Lichtverteilungsverhältnisse in der Austrittspupille so stark, daß ein einwandfreier Phasenkontrast und in extremen Fällen eine brauchbare Abbildung überhaupt nicht mehr zustande kommt. Ob solche Verhältnisse vorliegen, läßt sich leicht feststellen, indem man die Austrittspupille des Objektivs mit dem Hilfsmikroskop einstellt. Ist das Objekt in der beschriebenen Weise für die phasenmikroskopische Untersuchung ungeeignet, so ist das Bild der

Kondensorringblende nicht mehr erkennbar und infolgedessen auch ein genaues Zentrieren dieser Ringblende gegen die Phasenplatte unmöglich. Es wäre nun aber irrig, anzunehmen, daß sich dieser Mangel dadurch umgehen ließe, daß man erst eine andere Präparatstelle aufsucht, die die einwandfreie Abbildung des Ringblendenbildes ermöglicht, und dann das Präparat verschiebt. Wenn keine einwandfreie Abbildung der Ringblende zustande kommt, wird auch kein guter Ph.-K.-Effekt erreichbar sein. Handelt es sich dagegen um zwar dicke, in der Tiefenausdehnung des Präparates aber nahezu optisch homogene oder zumindest wenig strukturierte Objekte, so hat die Dicke des Präparates keinen merklichen Einfluß auf das Ergebnis. In solchen Fällen wird die Grenze für die Präparatdicke lediglich durch die optischen Daten des Kondensors, und zwar durch dessen Schnittweite, bedingt. Auf keinen Fall darf die Präparatdicke bzw. die Entfernung Objektträgerunterfläche—Deckglasoberfläche einen so großen Wert annehmen, daß die Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung unmöglich wird.

Wenn man nun die Eignung bestimmter Objekte für die Ph.-K.-Mikroskopie prüft, so kann man feststellen, daß die günstigsten Verhältnisse da vorliegen, wo ohnehin Objekte von möglichst geringen Ausmaßen untersucht werden müssen. Diese Bedingung erfüllen bei lebenden oder überlebenden Objekten am besten isolierte Zellen, annähernd einschichtige Zellverbände, kleinere Protozoen und einzelne Bakterien oder auch gelegentlich randständige Feinstrukturen größerer Strukturkomplexe. Solche Verhältnisse lassen sich durch vorsichtige Isolationsverfahren in den meisten Fällen herstellen. Enthält, wie dies z. B. bei Blut, Eiter usw. der Fall ist, eine Zellsuspension die geformten Elemente in zu dichter Lagerung, so wird man sie mit einer physiologischen Flüssigkeit so weit verdünnen, bis in der kapillaren Flüssigkeitsschicht zwischen Objektträger und Deckglas die Zellen nur in einer Lage und nicht zu dicht vorliegen. Bei der entgegengesetzten Situation mit zu spärlichen geformten Elementen wird man durch Sedimentieren eine Anreicherung herbeiführen. Von Epithelien, wie z. B. dem der Mundhöhle, der Konjunktiva, der Vagina usw., lassen sich durch mehr oder weniger starkes Abstreichen reichlich Zellen der verschiedenen Epithelschichten erhalten; die dann auch noch in physiologischer Lösung aufgeschwemmt werden. Aus frischen Organen, auch Tumoren, können durch Ausschwemmen mit solchen Lösungen, eventuell unterstützt auch durch gröbere mechanische Maßnahmen, Zellen oder hinreichend kleine Zellverbände isoliert werden. Bei all diesen Verfahren, die von Fall zu Fall der Eigenart des Untersuchungsmaterials angepaßt werden müssen, kommt es schließlich nur darauf an, die optischen Bedingungen zu erfüllen, die die physikalischen Eigenarten des Ph.-K.-Verfahrens fordern.

Bei der Wahl des Einschlußmediums für solche lebenden Objekte ist es allerdings wichtig, zu untersuchen, ob physiologische Lösungen, wie z. B. Ringer- oder Tyrodelösung, im gegebenen Falle auch wirklich physiologisch sind. Man wird da häufig die überraschende Feststellung machen, welche beträchtlichen Strukturveränderungen diese Lösungen hervorrufen können. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Arbeiten von ZOLLINGER und von HASELMANN und KAPPEL verwiesen.

Bei kurzen orientierenden Untersuchungen genügt es, einen Tropfen der Zellaufschwemmung od. dgl. auf den Objektträger zu bringen und mit einem Deckglas zu bedecken. Für die Untersuchung mit dem Immersionsobjektiv muß jedoch das Deckglas fixiert werden. Bei längerdauernden Untersuchungen ist es unumgänglich, eine Konzentrationsänderung der Flüssigkeit durch Verdunsten dadurch zu verhindern, daß man das Deckglas mit Paraffin oder einem Lanolin-Kolophonium-Gemisch umrandet. Wenn man mit solchen umrandeten Präparaten arbeitet, empfiehlt es sich aber, nach Möglichkeit nicht zu kleine Deckgläser zu verwenden, damit nicht die flache Objektivfront des Immersionsobjektivs an der Umrandung anstößt. Die Ver-

wendung eines dünnflüssigen Immersionsöles, wie es heute von verschiedenen Firmen auf Mineralölbasis hergestellt wird, an Stelle des üblichen eingedickten Zedernholzöles ist sehr zweckmäßig, da dann die geringere Viskosität eine Mitbewegung des Deckglases (im Sinne einer Durchbiegung) bei der Bedienung der Mikrometerschraube und damit eine Verschiebung innerhalb des Präparates vermeidet.

Sollen ungefärbte Präparate, in denen sich nur wenige, kleine Partikel befinden, mit starken Objektiven eingestellt werden, so besteht die Gefahr, daß durch Aufstoßen mit dem Objektiv Gewebeelemente auseinander gesprengt werden oder gar das Deckglas zertrümmert wird. Es sei daher für solche Fälle ein Vorgehen empfohlen, das von den üblichen Gebrauchsanweisungen etwas abweicht. Man stellt hierzu mit dem gewünschten Objektiv in der vorschriftsmäßigen Weise im Ph.-K. erst ein gefärbtes Präparat ein und ersetzt es dann durch das ungefärbte Präparat. Die Zentrierung der Ringblende muß dann unter Umständen noch einmal nachjustiert werden, da praktisch alle Präparate etwas keilförmig sind. Auf jeden Fall ist aber bereits ein so weitgehender Kontrasteffekt vorhanden, daß die Auffindung der richtigen Einstellebene wesentlich erleichtert wird.

Ist die erreichbare kapillare Flüssigkeitsschicht zwischen Objektträger und Deckglas zu dünn, so kann ein Objektträger mit aufgeschmolzenem oder aufgekittetem Glasring oder Glasrahmen verwendet werden. Wo solche Objektträger nicht zur Verfügung stehen, können auch flache Metallringe geeigneter Dicke mit Vaseline auf den Objektträger aufgeklebt werden (den Hinweis auf diese Anordnung verdanke ich Herrn Dr. L. TRAPP). Auf diese Art und Weise läßt sich eine Flüssigkeitskammer mit beliebiger Kammertiefe schaffen. Objektträger mit ausgeschliffener Höhlung, wie sie z. B. in der Bakteriologie bei der Methode des hängenden Tropfens Verwendung finden, sind für die Ph.-K.-Mikroskopie völlig ungeeignet, da sie als Plankonkavlinse mit in das optische System Kondensor—Objektiv eingehen würden und die Ringblende infolgedessen nicht mehr mit der Phasenplatte zur Deckung gebracht werden könnte. Eine wertvolle Methode, um isolierte Zellen zur phasenmikroskopischen Untersuchung in ihrer Lage im physiologischen Milieu unbeweglich festzuhalten, hat MICHEL für seine Zeitrafferfilmaufnahmen entwickelt. Er bringt in die Flüssigkeitskammer auf dem Objektträger Paraffinöl und hierauf in dünner Schicht die physiologische Flüssigkeit mit den zu untersuchenden Zellen. Dadurch werden sowohl in optischer wie auch in physiologischer Hinsicht günstige Verhältnisse geschaffen. Die Zellen liegen auf diese Weise unmittelbar und unbeweglich unter dem Deckglas und können daher auch mit Immersionsobjektiven untersucht werden. Verschiedene ausgezeichnete Methoden zur Untersuchung lebender Bakterien wurden von DYAR, von KNÖLL und von RICHARDS beschrieben. HASELMANN und KAPPEL berichteten über eine Methode zur Untersuchung lebender Bakterien in der Objektträgerkultur. FARRIS benutzte das Ph.-K.-Verfahren erfolgreich für die Spermaanalse zur Fertilitätsuntersuchung. ALBERTINI, LÜDIN und ZOLLINGER beschreiben Untersuchungen von normalen und pathologischen Geweben und Zellen, insbesondere zeigen sie überzeugende Abbildungen von Zellausschwemmungen und Exudatbefunden aus Tumoren im Ph.-K.-Bild. RUNGE, VÖGE und HASELMANN sowie ZINSER wandten das Ph.-K.-Verfahren mit Erfolg an Stelle der Papanicolaufärbung für die zytologische Untersuchung des Vaginalsmears an (Abb. 1). In der inzwischen schon recht umfangreich gewordenen Literatur über das Ph.-K.-Verfahren finden sich noch zahlreiche weitere Angaben über methodische Einzelheiten bei den verschiedensten Fragestellungen, deren vollständige Aufzählung an dieser Stelle sich aus der notwendigen Beschränkung des Umfanges dieser Arbeit verbietet.

Der Bereich der erfolgreichen Anwendung der Ph.-K.-Mikroskopie beschränkt sich aber keineswegs nur auf lebendes Gewebe. Auch fixierte und ungefärbte Schnittpräparate, gleich welcher Technik, sind für die Untersuchung mit dem Ph.-K.-Mikro-



Abb. 1. Karzinomzelle (Tadpole-Form). Aufschwemmung eines Vaginalabstriches von einer Patientin mit einem Portiokarzinom in Ringer-Lösung. Phasenkontrast. Objektiv: Apochromat Ph 60 H. I., num. Apertur 1,40. Abbildungsmaßstab 1000:1.



Abb. 2. Lymphknoten (Katze). Susa-fixierter Paraffinschnitt, in Xylol ungefärbt eingeschlossen. Phasenkontrast. Objektiv: Achromat Ph 20, num. Apertur 0,40. Abbildungsmaßstab 200:1.

skop geeignet (Abb. 2). Allerdings liegen nach meinen Erfahrungen gerade hier die Verhältnisse häufig so, daß ein Einschließen der Schnitte in die üblichen Medien, wie Kanadabalsam, Dammarharz, Caedax oder Clarit, unzumutbar ist. Es entstehen sonst unter Umständen Verteilungen der Helligkeitswerte, die mit unseren Erfahrungen, wie wir sie aus der Hellfeldmikroskopie gefärbter Präparate und von Mikrophotographien her besitzen, nicht in Einklang zu bringen sind. Aber auch in so gelagerten Fällen, die durch die Eigenart der Lichtbrechungsverhältnisse bedingt werden, erscheint mir die Anwendung von Objektiven mit verschiedenen Phasenplatten nicht notwendig. Es genügt vielmehr, die Einschlußmedien zu variieren, um Bilder zu erhalten, die unseren Erfahrungswerten aus den Ergebnissen herkömmlicher Methoden entsprechen. Die günstigsten Ergebnisse liefern hierbei meist Einschlußmittel, deren Brechungsindex etwas unter dem sonst üblichen liegt. Die eingehendere Behandlung dieser Frage wird noch Gegenstand einer besonderen Mitteilung sein.

Während in der Literatur über das Ph.-K.-Verfahren fast ausschließlich die Untersuchung von Nativmaterial oder fixiertem, aber ungefärbtem Material beschrieben wird, habe ich mich immer wieder eingehend auch mit der Bedeutung des Ph.-K.-Verfahrens bei der Untersuchung gefärbter Präparate beschäftigt. Der Gewinn, den in diesem Falle die Methode bietet, ist bei vielen gefärbten Präparaten so

Abb. 3. Flimmerepithel mit Becherzellen aus dem Ösophagus vom Frosch. Normales, in Caedax eingeschlossenes Schnittpräparat. Azanfärbung. Phasenkontrast. Objektiv: Achromat Ph 90 H.I., num. Apertur 1,25. Abbildungsmaßstab 600:1.

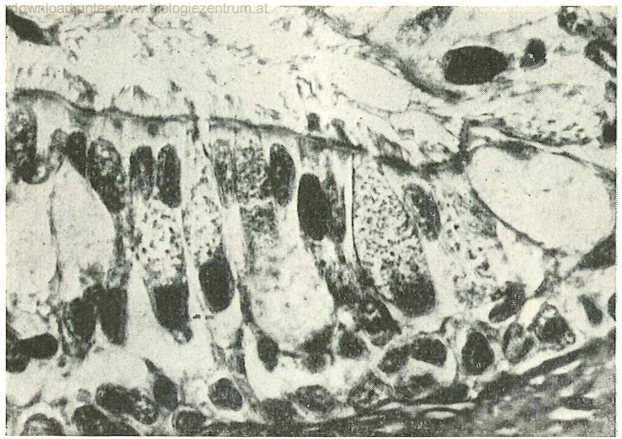


Abb. 4. Gleiches Präparat wie in Abb. 3. Hellfeld, sonst gleiche optische Daten.



überzeugend, daß ich stets Besuchern, die sich von mir das Verfahren vorführen lassen, auch gefärbte Präparate im Ph.-K.-Mikroskop zeige. Die Abb. 3—6, die Vergleichsaufnahmen gefärbter Präparate im Ph.-K.-Bild und im Hellfeld zeigen, mögen hiervon einen Begriff geben. Es ergibt sich dabei immer wieder die Tatsache, daß die Färbetechnik keineswegs die Summe aller Objektstrukturen sichtbar darstellt. Es sind auch nicht nur schlecht oder schwach gefärbte oder ausgeblaßte Präparate, auf die diese Feststellung zutrifft. Auch bei hervorragend gelungenen Färbungen erlebt man hier nur zu oft Überraschungen. Am besten scheint allerdings die Azanfärbung für die Ph.-K.-Untersuchung geeignet zu sein. Bei Silberimprägnationen von Nervengewebe sieht man häufig, daß die intensive Schwärzung des Silberniederschlags im Ph.-K.-Bild verschwindet oder zumindest wesentlich blasser wiedergegeben wird, dafür aber aus dem im Hellfeld unstrukturierten Untergrunde nicht imprägnierte nervöse und andere Zellelemente auftauchen (Abb. 7 und 8). Oder in gefärbten Präparaten, bei denen im Hellfeld im Bindegewebe lediglich die Kerne der Fibrozyten deutlich sichtbar sind, werden plötzlich auch deren zytoplasmatische Anteile in ihrem retikulären Zusammenhang sichtbar (Abb. 9 und 10). Derartige Beispiele lassen sich beliebig vermehren. Gelegentlich finden sich allerdings auch gefärbte Präparate, die gar nicht zur phasenmikroskopischen Untersuchung geeignet erscheinen.

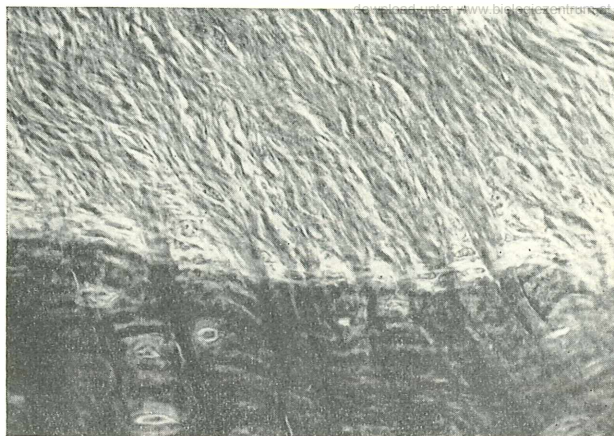


Abb. 5. Molar vom Hund. Übergang Periodontium — Alveolarknochen mit Sharpey'schen Fasern. Normales, in Caedax eingeschlossenes Schnittpräparat. Azanfärbung. Phasenkontrast. Objektiv: Achromat Ph 90 H. I., num. Apertur 1,25. Abbildungsmaßstab 400:1.



Abb. 6. Gleiches Präparat wie in Abb. 5. Hellfeld, sonst gleiche optische Daten.

Hier treten infolge von Interferenzerscheinungen, die durch besondere Absorptions- und Lichtbrechungsverhältnisse im Objekt bedingt werden, Farbumschläge auf. Diese müssen aber keineswegs immer störend in Erscheinung treten, sondern können auf charakteristische Feinheiten im färberischen Verhalten, die im Hellfeld normalerweise der Aufmerksamkeit entgehen, hinweisen. Als Modellobjekt für dieses Phänomen kann der Farbraster einer alten Agfacolor-Platte dienen. Die einzelnen Farbkörner des Rasters, die sich durch ihre besonders reinen und gleichmäßigen Farbtöne auszeichnen, zeigen mehr oder weniger starke Farbveränderungen im Ph.-K.-Bild, je nach der Größe dieser Rasterkörner. Auch solche Farbumschläge lassen sich durch den Wechsel des Einschlußmediums unterdrücken, doch erscheint mir das hier nicht so wichtig wie bei der Untersuchung ungefärbter Präparate. Dazu kommt noch die Tatsache, daß die in Frage kommenden Einschlußmedien sich zum Teil Farbstoffen gegenüber nicht indifferent verhalten, sondern sie aus dem Objekt herauslösen.

Das für Ph.-K.-Untersuchungen eingerichtete Mikroskop läßt sich ohne merkliche Nachteile auch für normale Hellfelduntersuchungen verwenden, da der Kondensorrevolver auch die normale Irisblende (Aperturblende) enthält. Die Phasenplatte in den Objektiven wirkt sich bei der Hellfeldbeobachtung nicht merklich aus, lediglich bei schiefer Beleuchtung tritt eine deutliche Lichtintensitätsverminderung

Abb. 7 Kleinhirn, Mensch. Normales, in Dammarharz eingeschlossenes Schnittpräparat. Stückimprägnation nach BOEKE. Phasenkontrast. Objektiv: Achromat Ph 20, num. Apertur 0,40. Abbildungsmaßstab 225:1.

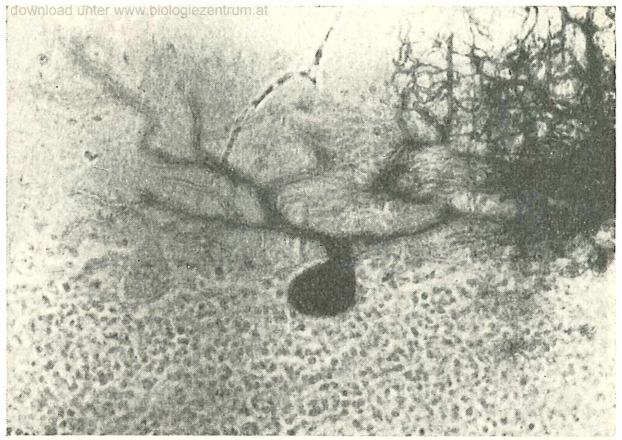
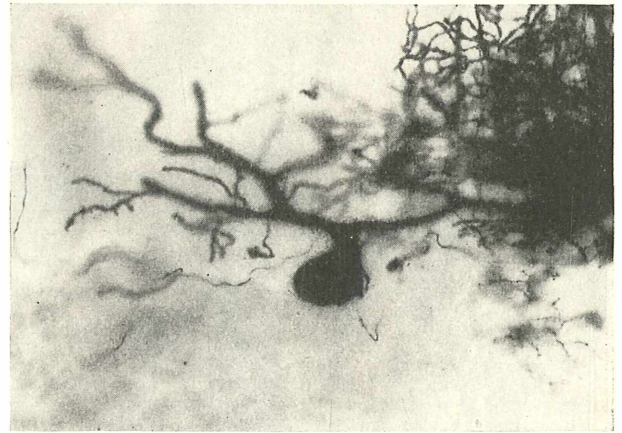


Abb. 8. Gleiches Präparat wie in Abb. 7. Hellfeld, sonst gleiche optische Daten.



dann ein, wenn in der Austrittspupille des Objektivs das Bild der eingestellten Kondensorblende mit einem Abschnitt der Phasenplatte zur Deckung kommt. Dies erscheint mir jedoch als ein Sonderfall von geringer praktischer Bedeutung.

Aus der Kombination des Ph.-K.-Verfahrens mit einer polarisationsoptischen Anordnung ergaben sich bei biologischen Präparaten nur selten Vorteile, doch konnte ich z. B. an Knochenschliffen auf diese Weise gelegentlich besonders schöne Bilder erzielen.

Die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode deckt verständlicherweise auch schonungslos die Mängel der Präparate auf. So sind an Schnittpräparaten häufig die Spuren feinsten Scharten des Mikrotommessers zu sehen, bei Dünnschliffen werden manchmal die Schmirgelspuren sichtbar, und auch alle Verunreinigungen werden, gelegentlich deutlicher als die Objektstrukturen, abgebildet.

Kritik der Ergebnisse

Ein Gesichtspunkt, der bei der Beurteilung der mit dem Ph.-K.-Verfahren gewonnenen Bilder bis jetzt wohl noch zu wenig beachtet wurde, liegt in den erkenntnis-kritischen Schwierigkeiten ihrer Deutung. Während das Absorptionsbild der Hellfeld-



Abb. 9. Zahnpulpa. Molar vom Hund. Normaler, in Caedax eingeschlossener Zelloidinschnitt. Azanfärbung. Phasenkontrast. Objektiv: Achromat Ph 20, num. Apertur 0,40. Abbildungsmaßstab 200:1.

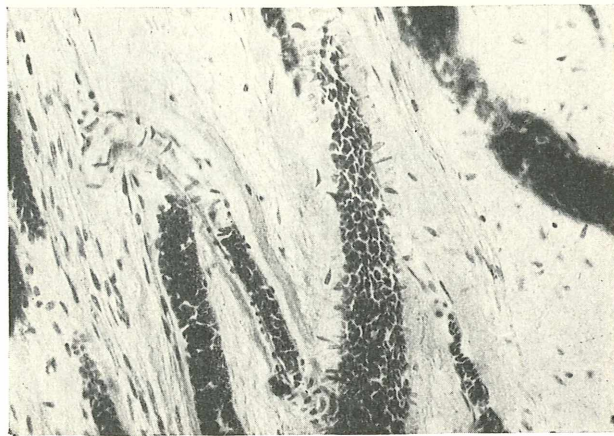


Abb. 10. Gleiches Präparat wie in Abb. 9. Hellfeld, sonst gleiche optische Daten.

mikroskopie in sinnesphysiologischer Hinsicht dem makroskopischen Bild des gleichen Objektes durchaus äquivalent ist und sich lediglich durch die Vergrößerung in der Wahrnehmung von ihm unterscheidet, liegen diese Verhältnisse bei der Ph.-K.-Mikroskopie grundsätzlich anders. Im Gegensatz zur Hellfeldmikroskopie, bei der theoretisch die von der Abbeschen Theorie geforderte Übereinstimmung der Lichtverteilung in Objekebene und Bildebene in bezug auf Amplitude und Phase vorliegt, wird ja bei der Ph.-K.-Mikroskopie diese Übereinstimmung bewußt gestört, um überhaupt erst eine Umsetzung der unsichtbaren Phasenunterschiede in sichtbare Intensitätsunterschiede zu erreichen. Es wird hier eine Skala von verschiedenen Grauwerten transponiert. Es handelt sich somit durchaus um eine indirekte Wahrnehmung, nicht nur hinsichtlich der Tatsache des als Hilfsmittel bei der Wahrnehmung benützten Mikroskops. Vielmehr auch insofern, als hier Objekteigenschaften als Strukturen sichtbar gemacht werden, die unserer direkten Wahrnehmung grundsätzlich entzogen sind. Wir sehen hier Dinge, für die der durch die spezifischen Eigenschaften unserer Sinnesorgane bestimmte Erfahrungsinhalt unserer Vorstellungswelt aus dem Bereiche der direkten Wahrnehmung her keine empirischen Maßstäbe besitzt. Diese Notwendigkeit einer kritischen Beurteilung des phasenmikroskopischen Bildes mit seinem uns so

bekannt anmutenden und stark an Mikrophographien erinnernden Charakter wird allein schon durch den Umstand bestimmt, daß die Werte der resultierenden Grauwertskala gar nicht absoluten, größenmäßig definierten Lichtbrechungswerten entsprechen, sondern relative Registrierungen der optischen Weglängendifferenzen darstellen. Im Gegensatz zur färberischen Differenzierung der Strukturelemente, die eine empirische Auswertung des färberischen Verhaltens durchaus ermöglicht, besitzt die Skala der phasenmikroskopischen Kontraste nur eine sehr bedingte Spezifität. Hierin dürfte auch eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Anwendung von Objektiven mit verschiedenen Phasenplatten beschlossen liegen. Dabei verschieben sich ja auch die Helligkeitswerte für die einzelnen Phasenverschiebungen, die Skala der Phasenverschiebungen verschiebt sich also gegenüber der Skala der Helligkeitswerte. Aber auch ohne Verwendung verschiedener Phasenplatten kann man sich von dieser gewissen Unspezifität der Kontrastwerte überzeugen. Normalerweise stellen sich z. B. die Zellkerne auch phasenmikroskopisch dunkler dar als das Zytoplasma. Doch gerade bei den in Kanadabalsam eingeschlossenen fixierten, aber ungefärbten Präparaten kann häufig eine völlige Inversion dieser Helligkeitswerte eintreten, die auf den besonderen hier resultierenden Phasendifferenzen beruht und die sich durch Imbibition mit Einschlußmitteln von anderem Brechungsindex, wie oben bereits ausgeführt, beheben läßt. Es ist aber durchaus unzulässig, bestimmte Strukturen, Organellen oder chemische Substanzen gesetzmäßig mit bestimmten Tonwerten im Ph.-K.-Bild identifizieren zu wollen. Das kann diese Methode einfach nicht leisten. Die Versuchung, derartige Schlüsse dennoch zu ziehen, liegt aber nur allzu nahe, wenn dies nicht durch die genaueren Kenntnisse der physikalischen Grundlagen des Verfahrens verhindert wird. Die Dominanz der Hellfeldmikroskopie und der färberischen Präparationstechnik hat die Bildung der Erfahrungswerte im Bereiche der mikroskopischen Wahrnehmung zu lange einseitig beeinflußt, um uns einem rein optisch von einem Phasenobjekt gewonnenen Strukturbilde unbefangen gegenüberstehen zu lassen. Der hervorragende Anwendungsbereich der Ph.-K.-Mikroskopie dürfte daher auch nicht in einer spezifischen Differenzierung von Strukturelementen liegen, sondern vielmehr in der Möglichkeit einer optimalen Darstellung von Strukturveränderungen im zeitlichen Ablaufe und in einer Wiedergabe von Strukturelementen, die der färberischen Darstellung schwer zugänglich oder völlig entzogen sind. Um Fehldeutungen zu entgehen, ist es jedoch unbedingt nötig, immer wieder die phasenmikroskopisch erhobenen Befunde so weitgehend als nur irgend möglich durch die Anwendung anderer Methoden zu kontrollieren. Gerade in dieser Hinsicht wird die Ph.-K.-Mikroskopie, und zweifellos nicht zu ihren Gunsten, häufig verkannt. Sie stellt keine Methode dar, die als Universalmethode an die Stelle der bisherigen Methoden treten kann. Wer dies erwartet, wird sehr bald enttäuscht zu den klassischen Methoden der Histologie zurückkehren. Sie bildet aber in ihrer kritischen Anwendung und in der Ergänzung dieser Methoden durch die Erweiterung der Strukturfassung eine Bereicherung unserer mikroskopischen Wahrnehmungswelt, deren heuristischer Wert heute noch keineswegs die ihm zukommende Beachtung findet und deren Anwendung auch sicherlich nicht ohne kritische Rückwirkung auf unsere Vorstellungen von der Natur und dem Werte der Ergebnisse unserer klassischen histologischen Technik bleiben wird.

Summary

This work is the first of a series of publications dealing with the subject of phase microscopy. It deals with problems facing the scientist carrying out practical work with phase contrast microscopy.

First follows a description of technical specialties about phase contrast equipment. When investigating living objects, it seems to be advisable to use an oil immersion objective with high numerical aperture and low initial magnification on account of its big magnifying range.

The technique of illumination required for exact phase contrast effects is specially dealt with.

The effective use of phase contrast investigations of different biological objects and the required technique of preparation will be discussed and explained with different examples.

The importance of exact physiological conditions in investigating living objects is specially stressed. The advantage of phase microscopy also for the investigation of fixed and even for stained sections, will be emphasized. The comparison of special photos demonstrates resulting advantages.

Special stress is laid on the critical discussion of results obtained with phase microscopy. The transformation of phase differences in different degrees of brightness makes visible physical qualities of objects in structural forms not visible with normal microscopes, since they offer no adequate stimulus to the human eye. By this method, details are laid open to our perception, the direct explanation of which so far lacks any empirical basis. This constitutes the danger that experiences gathered with classic staining histology are transferred on the result of phase microscopy with the consequence of possibly false conclusions. Of special importance is the fact that in contrast to the technique of staining the different grades of brightness in phase microscopy have no specificity but may be freely varied by technical manipulations. Therefore it is necessary to emphasize the application of extreme criticism in drawing conclusions out of phase microscopical results.

Literatur

1. *Albertini A. v.*, Acta Anat. **1** (1946): 463—468. — 2. Derselbe, Praxis, Schweiz. Rund. Med. Nr. 7 (1946). — 3. Derselbe, Schweiz. Z. Path. Bakt. **8** (1945): 298—310; **11** (1946): 701—706; **7** (1947): 4—29. — 4. *Benett A. H.*, *Jupnik H.*, *Osterberg H.* and *Richards O. W.*, Tr. Amer. Micr. Soc. **65** (1946): 99—131. — 5. *Dyar M. T.*, J. Bact. **54** (1947): 483—493. — 6. *Farris E. J.*, Anat. Rec. **97** (1947): 113; **100** (1948): Ref. — 7. *Haselmann H.*, Klin. Wschr. **26** (1948): 124, Ref.; **26** (1948): 701, Ref. — 8. *Haselmann H.* und *Kappel W.*, Arch. Derm. **187** (1949): 501—505. — 9. *Jones O. P.*, Anat. Rec. **97** (1947): 31, Ref.; **100** (1948): 49, Ref.; **97** (1947): 77, Ref. — 10. *Jones O. P.* und *Richards O. W.* Anat. Rec. **97** (1947): 101—102, Ref. — 11. *Knöll J.*, Zeiß-Nachr. **5** (1944): 38—53. — 12. *Köhler A.*, Forsch. Fortschr. **18** (1942): 173—175. — 13. *Köhler A.* u. *Loos W.* Naturwiss. **29** (1941): 46—61. — 14. *Lachenaud M.*, Rev. d'opt. **26** (1947): 205 bis 228. — 15. *Loos W.*, Zeiß-Nachr. **4** (1941): 58—63. — 16. Derselbe, Umschau **45** (1941): 635—637. — 17. *Loos W.*, *Klemm W.* und *Smekal A.*, Naturwiss. **29** (1941): 769 bis 770. — 18. *Lüdin H.*, Schweiz. Med. Wschr. **78** (1948): 710. — 19. *Michel K.*, Naturwiss. **29** (1941): 61—62. — 20. *Derselbe*, Handb. wiss. angew. Photogr. Erg.-Werk **1**: 546—555. Wien 1943. — 21. Derselbe, Zeiß-Nachr. **4** (1943): 236—251. — 22. Derselbe, Beih. Hochschulfilm C 443/1944. — 23. *Narath A.*, Optik **4** (1948): 9—10. — 24. *Osterberg H.*, J. Opt. Soc. Amer. **34** (1947): 773—774; **37** (1947): 726—730. — 25. *Picht J.*, Z. Instr. Kde. **56** (1936): 363—368; **56** (1936): 481—489; **58** (1938): 1—12. — 26. Derselbe, Angew. Chemie **50** (1937): 220, Ref. — 27. Derselbe, Verh. dtsh. phys. Ges. **18** (1937): 20—21, Ref. — 28. *Ralph P. H.*, Anat. Rec. **98** (1947): 219—221; **100** (1948): 73, Ref. — 29. *Richards O. W.*, Anat. Rec. **89** (1944): 20, Ref. — 30. Derselbe, Nature **154** (1944): 672. — 31. Derselbe, J. Bact. **51** (1946): 563—564; **51** (1946): 585, Ref.; **54** (1947): 4, Ref. — 32. Derselbe, Cold Spring Harbour, Symp. on Quant. Biol. **11** (1947): 208—214. — 33. Derselbe, J. Biol. Photo Assoc. **16** (1947): 29—38. — 34. Derselbe, Stain Technol. **23** (1948): 55—64. — 35. *Richter R.*, Optik **2** (1947): 342—345. — 36. *Runge H.*, *Vöge R.* und *Haselmann H.*, Z. Geburtsh. **9** (1949): 627—639. — 37. *Strugger S.*, Z. Naturforsch. **2b** (1947): 146—151. — 38. *Töpler A.*, Poggendorfs Ann. **127** (1866): 556—580. — 39. *Thomas O. L.*, Quart. J. Microsc. Sci. **88** (1947): 269—273. — 40. *Zeiß, Firma Carl*, Dtsch. Reichspat. Nr. 636.168 (1932). — 41. Derselbe, Druckschrift: Phasenkontrasteinrichtung. Mikro: 557. — 42. Derselbe, Druckschrift: Phasenkontrasteinrichtung. Beschreibung und Gebrauchsanweisung. Mikro: 572. — 43. *Zernike F.*, Physika **1** (1934): 689—704; **9** (1942): 686—697 und 974—986. — 44. Derselbe, Mthl. Not. Roy. Astron. Soc. **94** (1934): 377—384. — 45. Derselbe, Z. techn. Phys. **16** (1935): 454—457. — 46. Derselbe, Phys. Z. **36** (1935): 848—851. — 47. *Zinser H. K.*, Zentralbl. Gynäk. **69** (1947): 148—151. — 48. *Zollinger H. U.*, Experientia **4** (1908), 7: 312—314. — 49. Derselbe, Mikroskopie **3** (1948), 1/2: 1—11. — 50. Derselbe, Schweiz. Z. Path. Bakt. **11** (1948), 3: 276—282; **11** (1948), 6: 618—634. — 51. Derselbe, Amer. J. Path. **24** (1948): 545—567, 569—589, 797—811, 1039—1053.

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: 1950

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Haselmann Helmut

Artikel/Article: [Beiträge zur Phasenkontrast-Mikroskopie. I.Mitteilung: Praktische Methodik und kritische Betrachtungen. 214-224](#)