

LEITZ *Mitteilungen*

FÜR WISSENSCHAFT UND TECHNIK



Ausbleichen. Die Leichtigkeit, mit der die Verhältnisse für die Fluoreszenzanregung mittels Auflichtbeleuchtung in der Objektebene reproduziert werden können, ermöglicht das Messen vieler Zellen.

Zusammenfassung

Es wird die Fluoreszenzmikroskopie mittels eines neuen Auflichtilluminator-Typs unter Verwendung von ultraviolett, violett, blauem oder grünem Erregerlicht beschrieben. Die Benutzung von Schmalbandfiltern in Kombination mit dieser Beleuchtung wird erörtert. Es erfolgt weiterhin eine Besprechung der Verwendung von Fluoreszenz-Selektionsfiltern als Sekundärfilter (Sperrfilter) für die Verbesserung des Bildkontrastes bei mikroskopischen Präparaten.

Anschrift des Verfassers: Dr. J. S. Ploem, Polderweg 104, Amsterdam-6. Farmacologisch Laboratorium · Universiteit van Amsterdam.

Literatur

- Angelakos, E. T.: The formaldehyde condensation method for the histochemical demonstration for tissue monoamines. *J. Histochem. Cytochem.*, **12** (1964), 929—931.
- Böhm, N. and E. Sprenger: Fluorescence Cytophotometry; A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA. *Histochemie* **16** (1968), 100.
- Brumberg, E. M.: Primeleli interferencionny delintelnjkh zherkal v fluorescentioj mikroskopii. *Zh. obshch. biol.* **16** (1955), 222.
- Brumberg, E. M. and T. N. Krylova: O fluorescentnykh mikroskopakh. *Zh. obshch. biol.* **14** (1953), 461.
- Cebra, J. J. and G. Goldstein: Chromatographic purification of tetramethylrhodamine-immune globulin conjugates and their use in the cellular localization of rabbit γ -globulin polypeptide chains. *J. Immunol.* **95** (1965), 230.
- Corrodi, H. and G. Jonsson: The formaldehyde fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. A review on the methodology. *J. Histochem. Cytochem.* **15** (1967), 65.
- Eger, W., H. Kämmerer und L. Trapp: Simultane fluoreszenz- und polarisationsmikroskopische Untersuchungen an unentkalkten Dünnschliffen von Knochengewebe. *Zeiss-Mitt.* **64** (1967), 64.
- Eichler, J. und F. Walter: Ein Beitrag zur Fluoreszenzmikroskopie des Knochengewebes. *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn.* **4** (1967), 110.
- Falck, B., N. A. Hillarp, G. Thieme und A. Torp: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* **10** (1962), 348.
- Falck, B. und C. Owman: A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. *Acta Univ. lund. Sectio II, no. 7*, (1965).
- Goldman, M.: Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. I. Instrumentation for microfluorometry of stained amebae. *Exp. Parasit.* **9** (1960), 25.
- Goldman, M.: Fluorescent antibody methods. *Acad. Press New York* (1968).
- Grehn, J. und H. Kornmann: Kontrastfluoreszenz mit Opakilluminator. *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn.* **4** (1965), 108.
- Haitinger, M.: Fluoreszenz Mikroskopie. Akademische Verlagsgesellschaft Geest und Portig K.-G. Leipzig (1959).
- Hansen, P. A.: Spectral data of fluorescent tracers. *Acta Histochem.* **7** (1967), 167.
- Hijmans, W., H. R. E. Schuit, A. P. M. Jongasma und J. S. Ploem: Performance testing of fluorescent antisera against human immunoglobulins. Conference on standardization in immunofluorescence, London, October 1968. (In Press).
- Mansberg, H. P. und J. Kusnetz: Quantitative fluorescence microscopy: Fluorescent antibody automatic scanning techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **14** (1966), 260.

Es wird eine Anzahl Anwendungsmöglichkeiten der Auflichtbeleuchtung, wie z. B. bei der Immunfluoreszenz, der Supravital- und Vitalfärbung sowie den histochemischen Färbungen, beschrieben. Zum Schluß werden die vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten der Auflicht-Fluoreszenz bei der Mikrofluorometrie in der Immunofluoreszenztechnik und der Histochemie aufgezeigt.

Anmerkung

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Dr. J. B. BIJLSMA, Herrn Dr. P. van DUYN, Herrn Dr. J. H. JAMES, Frl. A. P. M. JONGSMA, Herrn Dr. W. HIJMANS und Frl. H. R. E. SCHUIT für die Überlassung mikroskopischer Präparate danken.

- Nairn, R. C.: Standardization in immunofluorescence. *Clin. exp. Immunol.* **3** (1968), 465.
- Nairn, R. C.: Fluorescent protein tracing, E. S. Livingstone, Edinburgh, London (1969).
- Ornstein, L., W. Mautner, J. D. Baruch und R. Tamura: New horizons in fluorescence microscopy. *J. Sinai Hosp.* **24** (1957), 1066.
- Otto, L. von: Einige gerätetechnische Erfahrungen aus der Fluoreszenzmikroskopie. *Acta Histochem.* **7** (1967), 345.
- Pernis, B., G. Chiappino, A. S. Kelus und P. G. H. Gell: Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissues. *J. of Exp. Med.* **122** (1965), 853.
- Pittman, B., G. A. Hebert, W. B. Cherry und G. C. Taylor: The quantitation of nonspecific staining as a guide for improvement of fluorescent antibody conjugates. *J. Immunol.* **98** (1967), 1196.
- Ploem, J. S.: Die Möglichkeit der Auflichtfluoreszenzmethoden bei Untersuchungen von Zellen in Durchströmungskammern und Leighton-Röhren. *Acta Histochem.* **7** (1967a), 339.
- Ploem, J. S.: The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. *Z. wiss. Mikr.* **68** (1967b), 129.
- Ploem, J. S.: Enkele methoden voor toxiciteitsonderzoek met behulp van weefselweekcellen. v. Gorcum, Assen (1967c).
- Ploem, J. S.: Standards for fluorescence microscopy. Conference on standardization in immunofluorescence, London, October 1968. (In Press).
- Porro, T. J., S. P. Dadik, M. Green und H. T. Morse: Fluorescence and absorption spectra of biological dyes. *Stain Tech.* **38** (1963), 37.
- Porro, T. J. und H. T. Morse: Fluorescence und absorption spectra of biological dyes II. *Stain Tech.* **40** (1965), 173.
- Rigler, R.: Microfluorometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by Acridine Orange. *Acta Physiol. Scand.* **67** (1966), 7.
- Ruch, F.: Determination of DNA content by microfluorometry. In: Wied, G. L. (ed.) Introduction to quantitative cytochemistry. *Acad. Press New York* (1966), 281.
- Schuit, H. R. E.: Recording the image by photography. Conference on standardization in immunofluorescence, London, October 1968. (In Press).
- Thaer, A. A.: Instrumentation for microfluorometry. In: Wied, G. L. (ed.) Introduction to quantitative cytochemistry. *Acad. Press, New York* (1966), 409.
- Trapp, L. von: Über Lichtquellen und Filter für die Fluoreszenzmikroskopie und über die Auflichtfluoreszenzmethode bei Durchlichtpräparaten. *Acta Histochem.* **7** (1967), 327.
- Walter, F.: Eine Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung für die Routine-diagnose. *Leitz Mitt. Wiss. u. Techn.* **6** (1968), 186—187.
- Weber, K.: Leitz-Mikroskop-Photometer MPV mit variabler Meßblende. *Leitz Mitt. Wiss. u. Techn.* **4** (1965), 103.

Die Technologie des LEITZ-Fluoreszenzopak

Von Winfried Kraft, Wetzlar*)

DK 535.824.33:535.822.5

In der Fluoreszenzmikroskopie wurde bis vor wenigen Jahren fast ausschließlich Durchlichtbeleuchtung angewandt und die Diagnose nach dem visuellen Eindruck und der Erfahrung des jeweiligen Beobachters gestellt. Dabei konnte das Untersuchungsergebnis durch eine Reihe von Faktoren ungünstig beeinflusst werden. Dazu zählen zu dicke mikroskopische Präparate, zu starke Fluorochromierungen verbunden mit einer zu hohen Absorption, nicht lichtbeständige Fluorochrome und vor allem zu einseitige Fluorochromierungen mit einem einzigen jeweils bekannten Fluoreszenzfarbstoff, auch solchem mit zu niedriger Quantenausbeute, obwohl andere Fluorochrome in einigen Fällen sehr viel besser geeignet wären.

Bei der Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen muß man zunächst aus der Vielzahl jener Farbstoffe diejenigen aussuchen, die für den jeweiligen Fall geeignet sind. Auch können zwei oder mehrere spezifische Färbungen mit sehr verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften in einem Präparat vorteilhaft sein. Deshalb ist es von entscheidender Bedeutung, die Exzitations- und Emissionsspektren der in Betracht kommenden Fluorochrome zu kennen (HANSEN, 1964). Um die geeigneten Erreger- und Sperrfilter beschaffen zu können, sind unter Umständen dahingehende Untersuchungen erforderlich. Dabei wird es nahezu unmöglich sein, mit nur jeweils einem Filter ein auch nur annähernd befriedigendes Ergebnis zu erzielen. Die Erfahrungen langer Versuche zeigen vielmehr, daß nur ausgewählte Filterkombinationen einen hinreichend dunklen Untergrund und damit zufriedenstellenden Kontrast ergeben.

Aus diesem Grunde kann man für die Fluoreszenzmikroskopie auch nicht vorbehaltlos alle verfügbaren Objektive verwenden. So werden z. B. für die chromatische Korrektur und die Bildfeldebahn bestimmte hierfür geeignete Glassorten verwendet, die aber zum Teil für die Fluoreszenzmikroskopie ganz ungeeignet sind.

Man muß hier andere Maßstäbe für die Verwendbarkeit der Objektive in der Fluoreszenzmikroskopie setzen und sollte nicht unbedingt meinen, daß ein

gut geebener Apochromat auch in allen Fällen das Optimum bei der Fluoreszenzuntersuchung darstellt. Das Kriterium ist hierbei die Eigenfluoreszenz einzelner Glassorten. Ohne jeden Zweifel sind apochromatisch korrigierte Objektive bezüglich ihrer chromatischen Korrektur die Spitzenklasse der Mikroskopoptik. Würde der optische Rechner jedoch aus korrekionstechnischen Gründen gezwungen, auch nur eine einzige Objektivlinse aus einer bei einer bestimmten Wellenlänge stark fluoreszierenden Glassorte herzustellen, kann dadurch dieses Objektiv für einen Teil der Fluoreszenzmikroskopie unbrauchbar werden.

Nur in wenigen Fällen läßt sich also ein Pauschalurteil über die Brauchbarkeit von Objektiven abgeben. Es kann ohne weiteres möglich sein, daß ein Objektiv z. B. bei UV-Anregung eine starke Eigenfluoreszenz zeigt, bei Anregung mit blauem Licht dagegen sehr wohl verwendbar ist. D.h., jeder Fluoreszenzmikroskopiker muß für seinen speziellen Fall selbst entscheiden, welcher Objektivtyp für seine Probleme die beste Lösung darstellt. Es ist daher zu empfehlen, mit einem nicht fluoreszierenden Glasobjekt vor Beginn irgendeiner Fluoreszenzmikroskopischen Arbeit die Autofluoreszenz aller in Frage kommenden Objekte mit der kompletten Filterkombination zu messen*). Eventuell ist zusätzlich die Spektralkurve dieser Autofluoreszenz aufzunehmen und auszuwerten. Für die quantitative Fluoreszenzmikroskopie mit einem Mikroskopphotometer ist dies grundsätzlich notwendig.

Bei zu dicken Präparaten wirkt sich eine Absorption des Fluoreszenzlichtes der unteren Präparatschichten bei Durchlichtanregung in den oberen Präparatschichten negativ aus. Bedingt durch den Charakter des zu untersuchenden Präparates kann wegen evtl. Schädigungen im Präparat häufig nur sehr schwach fluorochromiert werden. Solche schwa-

*) Aus Wiss. Abt. Entwicklungslabor Mikrophotometrie der Ernst Leitz GmbH.

**) Objektträger und Deckglas als Objekt verwenden, wobei die Objektträgeroberseite zweckmäßigerweise leicht markiert wird, damit ein Fokussieren möglich wird.

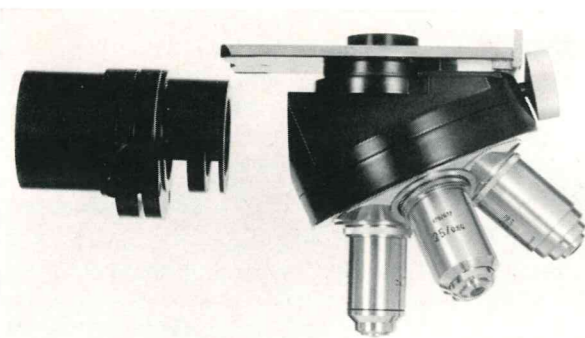


Abb. 1: LEITZ-Fluoreszenzopak

chen Fluorochromierungen sind aber bei der Beobachtung unter Durchlicht-Fluoreszenzanregung meist nur schwer zu erkennen. In solchen Fällen ist oft auch die wichtige Dokumentation mittels Farbphotographie auszuschließen, da bei den zu erwartenden langen Belichtungszeiten eine Schädigung der Präparate verbunden mit einer gleichzeitigen Ausbleichung — „Fading Effekt“ — die Folge ist. Ist in bestimmten Fällen hingegen eine starke Fluorochromierung möglich, so kommen Überstrahlungserscheinungen hinzu, die wesentliche Einzelheiten nicht

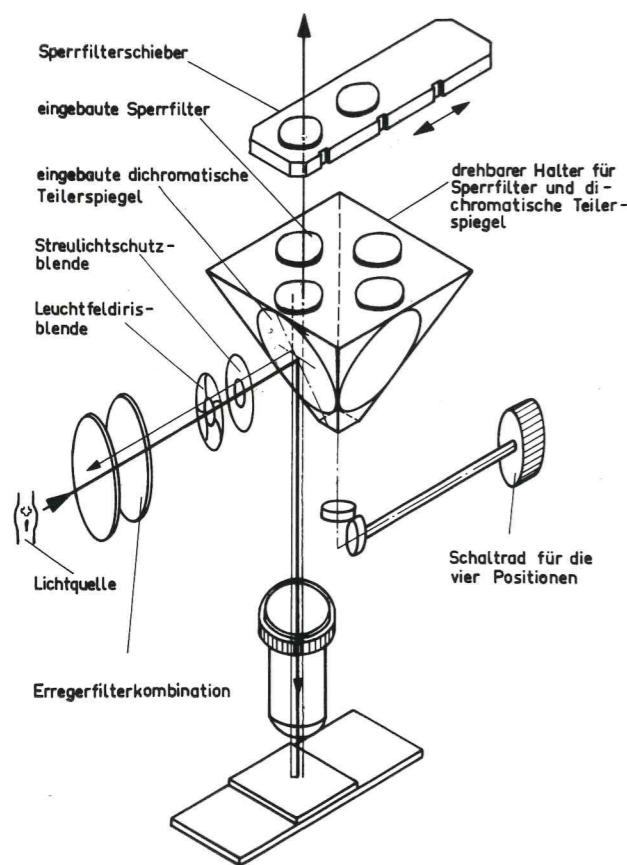


Abb. 2: Prinzipskizze des LEITZ-Fluoreszenzopak

mehr erkennbar werden lassen. Dies kann besonders in der Hämatologie und Cytologie zutreffen.

Diese Umstände führten schließlich zu der Aufricht-Fluoreszenzanregung. Man bediente sich einiger Aufrichtilluminatoren, die mittels 50% Teilerspiegel eine Fluoreszenzanregung und gleichzeitige Beobachtung ermöglichten. Dies war zunächst ein Fortschritt. Doch konnte auch diese Entwicklung nicht zufriedenstellend verlaufen, denn erstens konnten auch theoretisch nur 50% der Anregungsintensität zur Fluoreszenzanregung beitragen, und zweitens wurden nochmals 50% der Fluoreszenzintensität von diesen Teilerspiegeln zur Lampe reflektiert und gingen somit der Beobachtung verloren. Es muß hier deutlich hervorgehoben werden, daß der theoretische Endwert von 25% niemals erreicht wurde, denn an jeder Glas-Luftfläche werden etwa 4 bis 5% des ankommenden Lichtes reflektiert; bei vergüteten Glas-Luftflächen ist dieser Wert für den vergüteten Spektralbereich etwas geringer (ca. 1 bis 2%). Man kann somit sagen, daß weniger als 25% der theoretisch möglichen Fluoreszenzintensität zum Beobachter gelangen.

Hierbei ist darauf hinzuweisen, daß auch dieser Wert nicht für alle Wellenlängenbereiche gilt, denn auch die Reflexionen an einem sogenannten 50%-Teilerspiegel beträgt nur für einen bestimmten Spektralbereich ca. 50%. Da bei dem heutigen Stand der Fluoreszenzmikroskopie nahezu der gesamte Spektralbereich von ca. 250 bis ca. 600 nm zur Fluoreszenzanregung herangezogen wird, kann man sofort erkennen, daß ein 50%-Teilerspiegel vollkommen ungeeignet ist, um dem Fluoreszenzmikroskopiker in allen Fragen gerecht zu werden.

Einen Ausweg schafften BRUMBERG und KRYLOVA (1953). Der von ihnen entwickelte Fluoreszenzilluminator konnte an fast allen vorhandenen Mikroskoptypen verwendet bzw. adaptiert werden. Er hatte einen Interferenzteilerspiegel, der nur ultraviolettes und violett-blaueres Erregerlicht reflektierte. Damit konnte dieser Fluoreszenzilluminator bei Fluorochromen verwendet werden, die ein Exzitationsmaximum im ultravioletten und violett-blauen Bereich des Spektrums haben. Handelt es sich jedoch um Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Exzitationsmaximum im Blau- oder Grünbereich, so muß der Illuminator mit anderen Interferenzteilerspiegeln ausgerüstet werden.

Diesen Schritt verfolgte PLOEM (1965) weiter und entwickelte auswechselbare dichromatische Teilerspiegel für unterschiedliche Wellenlängenbereiche. Damit hatte er die Grundlage zu dem heutigen Fluoreszenzopak geschaffen (Abb. 1).

Wird von einer geeigneten Lichtquelle Licht der gewünschten Wellenlänge in ausreichender Intensität emittiert, so wird zunächst dieses Erregerlicht mit Hilfe von Erregerfiltern selektiert und trifft dann auf den unter einem Winkel von 45° zur Einstrahlungsrichtung stehenden sogenannten dichromatischen Teilerspiegel. Dieser reflektiert ca. 90% des Erreger-

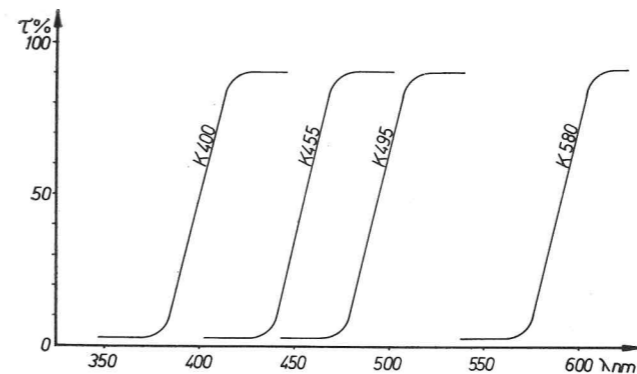


Abb. 3: Schematische Darstellung der Reflexionskanten und Durchlabbereiche der dichromatischen Teilerspiegel (links Reflexionsbereich, rechts Transmissionsbereich)

lichtes bis zu der jeweils angegebenen Reflexionskante — wobei die Zählrichtung vom ultravioletten bis zum roten Licht geht — (Abb. 2) durch das Objektiv, das hier gleichzeitig als Kondensator dient, zum Objekt. Im Objekt wird das Erregerlicht absorbiert und das Fluorochrom zur Strahlung angeregt. Das Objekt bzw. das Fluorochrom im Objekt wird jetzt zum Selbststrahler und strahlt ein charakteristisches Fluoreszenzlicht aus. Gleichzeitig wird ein kleiner Teil des Erregerlichtes im Objektiv, auf dem Deckglas und zum Teil im Objekt reflektiert. Es gelangt somit ein Mischlicht, bestehend aus Erregerlicht und Fluoreszenzlicht in das Objektiv. Am dichromatischen Teilerspiegel wird nun das reflektierte Erregerlicht wieder zu ca. 90% in Richtung der Lichtquelle abgelenkt, so daß nur Fluoreszenzlicht vom Teilerspiegel durchgelassen wird. Damit erfüllt der dichromatische Teilerspiegel auch eine erste Sperrfilterfunktion. Unmittelbar hinter dem dichromatischen Teilerspiegel ist ein dem dichromatischen Teilerspiegel entsprechendes Sperrfilter angeordnet, welches den Rest des noch verbleibenden Erregerlichtes absorbiert. Somit wird eine stufenweise Filterung vorgenommen.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, daß der verwendete Fluoreszenzfarbstoff nicht nur ein Fluoreszenzwellenlängenband, sondern mehrere aussendet, von denen eventuell eines herausgefiltert werden muß. Für diesen Fall ist eine Reihe von Sperrfiltern mit möglichst geringen Kantenabstufungen unerlässlich, wobei Stufen von etwa 10 bis 20 nm empfehlenswert erscheinen.

Weiterhin sind die Sperrfilter erforderlich, weil in einem Fluoreszenzopak nicht beliebig viele Plätze für alle erforderlichen dichromatischen Teilerspiegel vorhanden sind und somit die Fälle, die von den optimal eingebauten Möglichkeiten abweichen, eine zusätzliche Filterung mit vorgenannten Filtern notwendig machen.

Betrachten wir nun den Gewinn bezüglich der Fluoreszenzintensität ohne die anderen Verluste, die sowohl bei dem 50% Teilerspiegel als auch bei

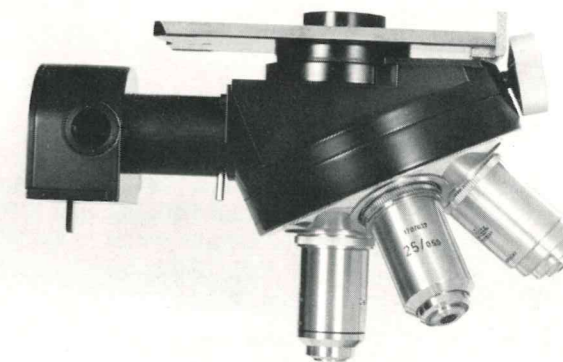


Abb. 4: Fluoreszenzopak mit seitlicher Einspiegelung für die Photometrie

den dichromatischen Teilerspiegeln auftreten, so stehen zur Anregung ca. 90% des Erregerlichtes zur Verfügung. Das bedeutet, daß wir etwa den Faktor 4 bezüglich der Fluoreszenzintensität gewinnen, sofern man für diese einfache Betrachtung lineare Verhältnisse zwischen Anregung und Fluoreszenz voraussetzen kann.

Die Reflexionskanten der dichromatischen Teilerspiegel (Abb. 3) K 400 / K 455 / K 495 / K 580 wurden mit den jeweils erforderlichen Erreger- und Sperrfiltern von PLOEM für das Erregerlicht einiger bestimmter Fluorochrome ausgewählt.

Abb. 5: Fluoreszenzopak in Frontansicht mit Schaltrad



Für den dichromatischen Teilerspiegel K 400 sind dies z. B. DANS-Fluoreszenzfarbstoffe und Auto-fluoreszenz von Pigmenten und Geweben.

Für den Teilerspiegel K 455 sind vor allem die Katecholamin-Reaktions-Produkte (Falck-Methode) zu nennen.

Es folgt für den Teilerspiegel K 495 Fluorescein-isothiocyanat (FITC), und für den Teilerspiegel K 580 sind Tetramethylrhodamin-isothiocyanat (TRITC), Lissamin-Rhodamin (RB 200), Pararosanilin und Feulgen-Färbung zu nennen.

Für diese wurden mit noch sinnvollem Aufwand nahezu ideale Verhältnisse für die Trennung von Exzitation und Emission erreicht. Es ergab sich dabei, daß nahezu alle bekannten Fluorochrome, die im Bereich von etwa 350 bis 560 nm ein Exzitationsspektrum und im Bereich von etwa 400 bis 700 nm ein Emissionsspektrum haben, erfaßt werden. Für die Fluoreszenzfarbstoffe, die nicht optimal erfaßt werden, liegen die Verhältnisse dennoch wesentlich besser als bei Verwendung eines 50%-Teilerspiegels. Bei der konstruktiven Ausführung wurde ein besonderer Wert auf hohen Kontrast und höchstmögliche Lichtausbeute gelegt.

Das Streulichtproblem, welches allen Fluoreszenzmikroskopikern Sorgen macht, wurde dadurch gelöst, daß eine feste Streulichtschutzblende eingebaut wurde. Sie ist im optischen Strahlengang (Beleuchtungs- und Abbildungsstrahlengang) nicht sichtbar. Die Streulichtschutzblende wurde für die Sehfeldzahl 18 angelegt, wobei die Pupillen der Objektive einen Durchmesser von 11 mm haben dürfen, ohne daß eine Vignettierung eintritt. Durch diese konstruktive Maßnahme wurde es möglich, prinzipiell alle Objektive, die für Sehfeldzahl 18 korrigiert sind, zu verwenden.

Die feste Streulichtblende durch eine Irisblende zu ersetzen, erwies sich nicht als besonderer Vorteil,

Anschrift des Verfassers: Ing. Winfried Kraft, Wiss. Abt. d. Optischen Werke Ernst Leitz GmbH Wetzlar, Labor Mikrophotometrie

Literatur:

- Brumberg, E. M., Fluorescence microscopy of biological objects using light from above. *Biophysics* 4 (1959), 97
- Eichler, J., und F. Walter, Ein Beitrag zur Fluoreszenzmikroskopie des Knochengewebes. *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. IV* (1967) 110—114
- Grehn, J., und H. Kornmann, Kontrastfluoreszenz mit Opak-Illuminator. *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. III* (1965), 108—111
- Hansen, P. A., Fluorescent Compounds used in protein. Absorption and Emission Data. Report University of Maryland (1964)
- Nairn, R. C., Fluorescent Protein Tracing. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1964
- Ploem, J. S., Fluorescentmicroscopie met opvallend licht gecombineerd met fascontrastmicroscopie met doornvallend licht. Hrg. Niederländische Vereinigung für Histochemie und Cytochemie, Leiden 1965

insbesondere bezüglich der maximalen Einstellung des Mikroskopes, da man diese Blende bewußt nicht scharf abbilden kann. Eine Aperturblende wäre widersinnig, denn sie würde lediglich die Lichtintensität schwächen, die wir durch die dichromatischen Teilerspiegel gewonnen haben. Wir arbeiten aus diesem Grunde mit der vollen Apertur der Objektive, die ja gleichzeitig als Kondensoren wirken.

Eine spezielle seitliche Einspiegelung (Abb. 4) ermöglicht das Photometrieren einzelner Objekt-details, ohne dabei die Objektpartien, die nicht gemessen werden, durch unnötige Bestrahlung zu schädigen.

Aufbau des LEITZ-Fluoreszenzopak nach PLOEM: (s. Abb. 1).

In einem Vierfach-Revolver befindet sich ein von außen drehbarer Halter mit den vier dichromatischen Teilerspiegeln und vier jeweils fest zugeordneten Sperrfiltern.

Am Schaltrrad (Abb. 5) sind vier Positionen mit Zahlen markiert, wobei die Zahl 3 der Kantenlage K 495 entspricht usw.

Für die Photometrie kann eine Einrichtung zur seitlichen Einspiegelung (s. Abb. 4) mitgeliefert werden. Dadurch ergibt sich gleichzeitig die Möglichkeit, mit zwei verschiedenen Lichtquellen in Auflichterregung durch Betätigen eines Schalthebels wahlweise zu arbeiten. Der Beobachter ist damit in die Lage versetzt, bei einer Fluorochromierung mit zwei in Anregung und Fluoreszenz unterschiedlichen Fluorochromen die entsprechende Filterkombination in zwei Lampenhäusern mit eventuell unterschiedlichen Lichtquellen wie Xenon- oder Quecksilberhochdrucklampen anzuordnen und durch einfaches Schalten wechselweise zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. S. Ploem für seine wissenschaftlichen Anregungen bei der Schaffung dieses Fluoreszenzopak.

- Ploem, J. S., Die Möglichkeiten der Auflichtfluoreszenzmethode bei Untersuchungen von Zellen in Durchströmungskammern und Leightonröhren. 10. Symposium d. Gesellschaft f. Histochemie, Nijmegen 1965, *Acta Histochem. Suppl.* 7 (1967), 339
- Ploem, J. S., The use of vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. *Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie u. mikrosk. Techn.* 68 (1967), 129—142
- Thaer, A. A., Instrumentation for fluorometry. In „Introduction to quantitative cytochemistry“, (Wied, G. L. ed.) Academic Press, New York 1966
- Trapp, L., Über Lichtquellen und Filter für die Fluoreszenzmikroskopie und über die Auflichtfluoreszenzmethode bei Durchlichtpräparaten. *Acta Histochem. Suppl.* 7 (1967), 327
- Walter, F., Eine Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung für die Routinediagnose. *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. IV* (1968), 186—187

Über fluoreszierende Mesenchymzellen (Fluorocyten)

Von H. Hamperl, Bonn

DK 535.822.5:611-013.395

Schon als ich mich vor 36 Jahren — vielfach noch zusammen mit HAITINGER — mit der Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe beschäftigte, fielen mir in manchen Organen, besonders aber in der Leber, Zellen auf, die im Fluoreszenzlicht hellgelb aufleuchteten, im gewöhnlichen Licht aber oft kaum hervortraten, da sie nur eine ganz blaß-hellgelbe Eigenfarbe besaßen. Jahre später (1950) habe ich dann diese Zellen und deren Vorkommen genauer untersucht und vorgeschlagen, sie „Fluorocyten“ (Fl.) zu nennen, da mir die besonders starke Fluoreszenz eine der wesentlichen Eigenschaften dieser Zellen zu sein schien.

Morphologie

Immer handelt es sich um größere Zellen von plumpspindelig bis abgerundeter Form mit einem großen, bläschenförmigen, d. h. verhältnismäßig chromatinarmen Kern (Abb. 1, 2). In dem reichlich vorhandenen Cytoplasma liegen rundliche Körnchen von verschiedener Größe, die hellgelb fluoreszieren (Abb. 3, 4, 7, 8). Ihre Eigenfarbe schwankt zwischen blaßgelb (Abb. 1) bis gelb-braun, wobei die Intensität der Fluoreszenz mit der Zunahme der Intensität der Eigenfarbe abnimmt. Diese Körnchen zeigen auch in anderer Hinsicht ein sehr kennzeichnendes Verhalten: Am leichtesten darzustellen sind sie für die Untersuchungen im Lichtmikroskop mit der PAS-Färbung (Abb. 2, 5), die auch nach Diastasebehandlung positiv ausfällt. Bei der Anwendung der ZIEHL-NIELSEN-Färbung stellen sie sich mit Fuchsin stark rot gefärbt dar, sind also gewissermaßen alkohol-

säurefest. Neuerdings sind Fl. auch mit Auramin und Thioflavin fluorochromiert worden (RICHARDS und GRAEF). Wenig verlässlich ist der Ausfall der Eisenreaktion, die in einer Gruppe von Fluorocyten deren viele darstellen kann, in einer anderen aber nur wenige oder überhaupt keine. Auch der Ausfall der Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL gibt zumeist nur eine braun-schwarze Färbung, mit der BODIAN-Imprägnation erscheinen die Körnchen hellbraun gefärbt.

Sehr kennzeichnend ist das Verhalten der Körnchen gegenüber Fettfarbstoffen. Auch im Paraffinschnitt, also nach Behandlung des Materials und der Schnitte mit Alkohol und Xylol ist nämlich noch immer eine sehr deutliche Anfärbung zu erzielen (Abb. 6). Gerade diese Widerstandsfähigkeit gegenüber Fettlösungsmitteln hat dazu geführt, daß man die fluoreszierenden Körnchen in die Gruppe der sog. Ceroidpigmente einreichte oder überhaupt als Ceroid bezeichnete. Der Name „Ceroid“ (LILLIE et. al.) soll dabei die wachsartige, also gegen Fettlösungsmittel unempfindliche Beschaffenheit des fettigen Stoffes in diesen Zellen anzeigen. Der Begriff Ceroid-Pigment wird neuerdings sehr ausgedehnt verwendet und schließt zum Beispiel bei HARTROFT und PORTA auch Lipofuscin sowie Lipochrome ein. Alle diese „ceroiden“ Pigmente zeigen zwar unleugbar morphologische Gemeinsamkeiten (Widerstand gegen Fettlösungsmittel, PAS-Färbung), andererseits aber auch morphologische Unterschiede in Gestalt, Silberimprägnation etc.; auch in ihrer biologischen Bedeutung und Herkunft sind die Ablagerungen in den Fl. vom Lipofuscin in den Leberzellen und Herzmuskelfasern verschieden. Man kann also GEDIGK und