

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

*Wissenschaftlicher Film D 1099/1972*

**Darstellung mikroskopischer Durchlichtverfahren  
am Beispiel überlebender Blutzellen**

Begleitveröffentlichung von

Prof. Dr. H.-J. ENGEL und REGINA SCHÜTZ, Berlin

GÖTTINGEN 1972

## Darstellung mikroskopischer Durchlichtverfahren am Beispiel überlebender Blutzellen

H.-J. ENGEL und REGINA SCHÜTZ, Berlin

### Allgemeine Vorbemerkungen<sup>1</sup>

Eine der wichtigsten Forderungen in der Mikroskopie ist die nach einer möglichst geringen Schichtdicke der Präparate. Je dünner sie sind um so weniger können sich Überlagerungen von Strukturen bemerkbar machen. Besonders bei stark vergrößernden Objektiven, die nur eine geringe Tiefenschärfe aufweisen, sind gute, dünne Präparate erforderlich. Bei fixierten und gefärbten Objekten ist diese Forderung heute meist relativ leicht zu erfüllen. Bei manchen überlebenden Zellarten wird sie sicher Schwierigkeiten bereiten. Nicht so bei der Untersuchung überlebender Blutzellen. Wenn Erythrozyten, Leukozyten und Blutplättchen einschichtig und nicht zu dicht nebeneinanderliegen, beträgt die Präparathöhe zwischen 3 und 5  $\mu\text{m}$ . Während die roten Blutzellen und die Blutplättchen bei der Präparatherstellung mechanisch unbehelligt bleiben, werden die weißen Blutzellen, die natürlicherweise in den Gefäßen rund sind und einen Durchmesser zwischen 6 und 18  $\mu\text{m}$  haben, mehr oder weniger abgeplattet. Solche, z.T. starken Verformungen werden von ihnen ohne Schaden ertragen. Durch die Pression werden sie sogar erst zur Aktivität angeregt. Sie verhalten sich dann so wie in ihrem eigentlichen Aktionsraum, in den Gewebsspalten des Organismus. Sie sind dort ähnlichen mechanischen Belastungen und Verformungen ausgesetzt.

### Zur Entstehung des Films

1. Hellfeld. Bei Hellfeldbeleuchtung ergeben überlebende, ungefärbte Blutzellen nur ungenügende, kontrastarme Abbildungen, weil sowohl zwischen den Zellen und ihrem natürlichen Suspensionsmedium, dem Blutplasma, als auch zwischen den einzelnen Strukturelementen der

<sup>1</sup> Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 9.

Zellen nur geringgradige Brechzahldifferenzen bestehen. Sie bewirken an den durchtretenden Lichtstrahlen nur Phasenverschiebungen, die dem Auge unsichtbar bleiben.

Wenn man dennoch die ungefärbten Blutzellen im Hellfeld relativ gut erkennen kann, dann deshalb, weil bei solchen ungefärbten Objekten stets auf optimalen Kontrast und nicht auf größte Schärfe eingestellt wird. Man fokussiert automatisch entweder etwas über oder unter die eigentliche Einstellebene. Aus diesen Bildern lassen sich zwar Aussagen zur Vitalität der Zellen machen, Veränderungen von Strukturen innerhalb der Zellen, z. B. Chromatinverdichtungen im Kern während der Degeneration, werden aber nicht deutlich.

2. Schiefes Hellfeld. Im schiefen Hellfeld werden die ungefärbten Zellen schon kontrastreicher dargestellt. Zur Kontraststeigerung kommt noch eine plastische Wirkung dieser Beleuchtungsart, die sich besonders an den Erythrozyten bemerkbar macht. Eine Eindellung in der Zellmitte deutet die Form dieser Zellart bereits an. Ihre genaue Form aber — es sind Rotationscassinoide — ist nicht abzulesen. Man sollte deshalb mit der Interpretation von Formen unbekannter Objekte vorsichtig sein.

Zu den Leukozyten lassen sich im schiefen Hellfeld keine weitergehenden Aussagen machen als im geraden Hellfeld.

3. Interferenzkontrast nach NOMARSKI. Mit dem Interferenzkontrastverfahren nach NOMARSKI läßt sich der Kontrast ungefärbter, lebender Objekte ebenfalls erhöhen. Neben der kontraststeigernden Wirkung macht sich ein reliefartig-plastischer Effekt bemerkbar. Da die Blutzellen in unseren Präparaten auf 3 bis 5  $\mu\text{m}$  abgeflacht sind, kann der Interferenzkontrast an ihnen nicht voll wirksam werden. Hinzu kommt, daß die Zellorganellen nur relativ geringe Unterschiede in der optischen Dichte aufweisen. Ebenso ist auch der Brechzahlunterschied gering zwischen Zellen und Suspensionsmedium. Die Zellen werden deshalb nicht sehr differenziert dargestellt, sie ähneln denen im schiefen Hellfeld. Aus optischen Gründen können hier außerdem nur Achromate verwendet werden, die ein geringeres Auflösungsvermögen besitzen als andere Objektive.

4. Dunkelfeld. Das Dunkelfeld macht besonders kleinste Objekte, die nicht zu dicht beieinanderliegen, gut sichtbar. Sie werden als leuchtende Beugungsscheiben auf schwarzem Grund abgebildet. In unseren Blutpräparaten wird von den Erythrozyten — wie bei der Hellfeldbeleuchtung — nur der Zellrand dargestellt, hier aber als leuchtende, ringförmige Kontur. Da die weißen Blutkörperchen meist relativ viel und sehr dichtliegende Granula enthalten, imponieren diese Zellen infolge der Überstrahlungen der Granula als kompakte, stark leuchtende Objekte, in die nicht näher einzusehen ist.

Das Dunkelfeldverfahren benötigt schon mehr Licht als andere mikroskopische Durchlichtmethoden. Zur filmischen Darstellung braucht man

aber besonders starke Lichtquellen. Überlebende Zellen werden dadurch jedoch geschädigt. Das zeigt sich bei den Blutzellen zuerst an den Leukozyten. Sie stellen ihre Aktivität ein und degenerieren sehr schnell. Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, daß die gleichen Zellen unter denselben Beleuchtungsverhältnissen bei der Beobachtung im Hellfeld erst später und nicht so stark geschädigt werden.

Bei der Dunkelfeldbeleuchtung mit dem Ultrakondensor kann man die abgeflachten Leukozyten in unseren Präparaten als 3 bis 5  $\mu\text{m}$  hohe, „flache Küvetten“ auffassen. Da der andersartige Aperturwinkel beim Dunkelfeldkondensor auch einen anderen Einfallswinkel in die Objekte bewirkt, ist die effektiv durchstrahlte Schichtdicke etwa doppelt so groß wie bei der Hellfeldbeleuchtung! Die Objekte absorbieren bei Dunkelfeldbeleuchtung also mehr Licht und erleiden dadurch Strahlenschädigungen, die sich in unserem Fall zuerst und sehr schnell an den Leukozyten manifestieren. Die Folgen der Strahlenschädigung im Dunkelfeld sind erst ab einer relativ geringen Beleuchtungsstärke, (Niedervolllampen), nicht mehr erkennbar.

5. Phasenkontrast (WILSKA und ZERNIKE). Für die Beobachtung ungefärbter, überlebender Objekte bietet sich das Phasenkontrastverfahren an. Objektbedingte, dem Auge unsichtbar bleibende Phasenunterschiede werden in sichtbare Amplitudenkontraste umgesetzt. Dabei werden auch geringgradige Brechzahlunterschiede, z. B. verschiedener Zellstrukturen, in abgestuften Grautönen dargestellt.

Es kann Geschmacksache sein, ob man das negative oder positive Phasenkontrastverfahren, also das nach WILSKA oder ZERNIKE, anwendet. Wir meinen, daß der positive Phasenkontrast mehr der Vorstellung entspricht, die man allgemein vom Aufbau eines Objekts hat, da die optisch dichten Strukturen dunkel auf hellem Grund erscheinen. Für die Darstellung überlebender Blutzellen hat sich uns der positive Phasenkontrast nach ZERNIKE als sehr günstig erwiesen.

Es wurde bereits von der Bedeutung der Präparathöhe in der Mikroskopie ganz allgemein gesprochen. Beim Phasenkontrast spielt sie eine besonders wichtige Rolle: je dünner die Präparate sind, um so besser lassen sich auch geringste Brechzahlunterschiede im Objekt feststellen. MICHEL [5] gibt an, daß bei einem Kontrast von 0,3 und einer Objektdicke von 5  $\mu\text{m}$  — das entspricht etwa unserer Präparathöhe — im Phasenkontrast noch Brechzahlunterschiede von 0,001 wahrgenommen werden!

Da außerdem die Leukozyten bei dieser Präparathöhe erst ihre volle Aktivität entfalten, sind das Phasenkontrastverfahren und insbesondere der positive Phasenkontrast für uns das Mittel der Wahl geworden.

Der beim Phasenkontrast auftretende sogenannte Halo-Effekt am Rand der Objekte ist unerwünscht, aber nicht vermeidbar. Die Intensität und Ausdehnung dieser Erscheinung ist einerseits apparativ bedingt und andererseits abhängig vom Brechzahlunterschied zwischen Objekt

und Umfeld. Je größer der Unterschied ist, um so ausgeprägter ist der Halo-Effekt. Bei Untersuchungen von Blutzellen in Blutplasma — ihrem natürlichen Suspensionsmedium — sind diese Lichtsäume erfreulicherweise relativ gering. Wir haben sie außerdem durch die Wahl bestimmter Objektive — Apochromat Ph 100/1,32 — auf ein Minimum reduzieren können. Da diese Objektive eine hohe numerische Apertur besitzen, sind sie schon deshalb für die Beobachtung feinsten Zellstrukturen, z. B. in den Monozyten, gut geeignet. Neben der Wahl der mikroskopischen Methode ist auch die Auswahl des Objektivs von großer Bedeutung.

Technische Daten: Die Vergrößerung ist bei allen Aufnahmen etwa 160fach (umgerechnet auf 16 mm Schmalfilm). Kamera: DEBRIE, PARVO L; Filmmaterial: Double X, 35 mm; Frequenz: 1 B/s, 2 B/s, 15 B/min und 30 B/min; Mikroskop: Reichert-DIAPAN<sup>1</sup> und Zeiss-WL-Stativ; Kondensator: achromatisch-aplanatischer Phasenkontrast- und Interferenzkondensator<sup>2</sup> (1,4), Ultrakondensator 1,2/1,4 und Anoptral-Kondensator; Objektiv: Anoptal-Achromat PhA 100/1,25, Planachromat 100/1,25, Planapochromat 100/1,30 mit Blende, Apochromat 100/1,32, Achromat Ph 100/1,25; Neofluar Ph 100/1,30 und Apochromat Ph 100/1,32; Beleuchtung: Hochleistungsleuchte 12 V, < 100 W; CSI-Lampe, 250 W und 100 W Halogenlampe; Filter: Interferenzbreitbandfilter, grün; Wärmeschutzfilter und Polarisationsfilter.

### **Erläuterungen zum Film<sup>3</sup>**

#### *Hellfeld*

1. Im Hellfeld wird bei farblosen Objekten unbewußt stets mehr auf optimalen Kontrast als auf größte Schärfe fokussiert. Die ungefärbten Blutzellen erscheinen deshalb relativ kontrastreich.
2. Dieses Präparat ist für Untersuchungen überlebender Blutzellen zu dick: der Leukozyt in der Bildmitte ist schlecht zu differenzieren, weil sich die Zellorganellen überlagern. Die Bewegungen des Leukozyten sind unregelmäßig und ungerichtet und deshalb nicht auszuwerten.
3. Erst eine geringe Präparathöhe von etwa 3  $\mu\text{m}$  macht die Differenzierung möglich und erzwingt zugleich eine optimale Aktivität des Leukozyten.
4. Morphe und Vitalität — hier eines neutrophilen Granulozyten — sind dann bereits im Hellfeld erstaunlich gut zu beurteilen.

---

<sup>1</sup> Wir danken Herrn R. SCHMIED, Fa. Pabisch, München, für dessen Hilfsbereitschaft und die leihweise Überlassung des DIAPAN.

<sup>2</sup> Wir danken der Fa. CARL ZEISS, Oberkochen, für die leihweise Überlassung der Interferenzkontrasteinrichtung und insbesondere den Herren der Berliner Filiale für deren Hilfsbereitschaft.

<sup>3</sup> Wortlaut des im Film gesprochenen Kommentars. — Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

### *Schiefes Hellfeld*

5. Die schiefe Hellfeld-Beleuchtung hat eine kontraststeigernde und plastische Wirkung. Die Form der roten Blutzellen ist dadurch schon angedeutet.
6. Aber erst bei optimaler Präparathöhe sind die weißen Blutzellen zu differenzieren und besitzen ihre volle Aktivität.
7. Während in dem eosinophilen Granulozyten die relativ großen, kompakten Granula plastisch-erhaben erscheinen, stellen sich die vakuolig zerfallenen Thrombozyten als kleine Krater dar.
8. Auch hier ist der Effekt der schiefen Hellfeld-Beleuchtung an den Erythrozyten deutlich. Der Monozyt erscheint dagegen weniger plastisch.
9. Sehr deutlich kommt die veränderte Form dieser fünf Tage alten Erythrozyten zum Ausdruck. Sie sind jetzt klein und stechapfelförmig.

### *Interferenzkontrast (NOMARSKI)*

10. Mit dem Interferenzkontrast-Verfahren läßt sich der Kontrast ungefärbter, lebender Objekte ebenfalls erhöhen. Hinzu kommt noch ein reliefartig-plastischer Effekt.
11. Bei dünnen Präparaten von etwa 3  $\mu\text{m}$ , wie sie die Vitaluntersuchungen des Blutes erfordern, wird der plastische Effekt des Verfahrens besonders an den kompakten, kugligen Granula deutlich.
12. Die verschiedenen Leukozytenarten sind zwar zu unterscheiden, Differenzen oder gar Änderungen der optischen Dichte, z.B. in Zellorganellen, werden aber nicht angezeigt.

### *Dunkelfeld*

13. Im Dunkelfeld stellen sich die Objekte sehr kontrastreich, helleuchtend auf schwarzem Grund dar. An dicht beieinanderliegenden Strukturen machen sich aber meist Überstrahlungen störend bemerkbar.
14. Da das Verfahren an sich und durch die Filmaufnahme insbesondere viel Licht benötigt, kommt es schnell zu Strahlenschädigungen an den Zellen. Sie werden inaktiv und degenerieren.
15. Insbesondere degenerieren die Leukozyten schnell. Sobald sie im Strahlengang sind, läßt ihre Vitalität nach. An diesem Monozyten erkennt man gut, wie gleichzeitig mit der Plasmaundulation auch die Granulakinetik eingestellt wird. Die Zelle erstarrt förmlich.
16. Ein ständiger Nachteil des Verfahrens liegt darin, daß zarte Strukturen, wie z.B. das Cytoplasma des Lymphozyten, nur dann sichtbar werden, wenn man Überstrahlungen anderer Objekte, hier der Erythrozyten, in Kauf nimmt.

### *Negativer Phasenkontrast (WILSKA)*

17. Im Phasenkontrast werden Zellen und Zellorganellen differenzierter dargestellt. Im negativen Phasenkontrast erscheinen die Objekte unterschiedlich hell auf dunklem Grund.

18. Die Bilder des negativen Phasenkontrasts haben eine entfernte Ähnlichkeit mit dem Dunkelfeld. Es werden hier aber mehr Einzelheiten sichtbar und zusätzlich auch Unterschiede in der optischen Dichte der Zellstrukturen. In dem Monozyten sind Granula und Kernstrukturen gut zu erkennen.
19. Die Bilder des negativen Phasenkontrasts scheinen aber immer etwas überstrahlt und deshalb leicht unscharf zu sein.

### *Positiver Phasenkontrast (ZERNIKE)*

20. Im positiven Phasenkontrast werden die Zellen abgestuft dunkel auf hellem Grund dargestellt. Die Präparathöhe spielt beim Phasenkontrast eine besonders wichtige Rolle.
21. Erst in optimal dünnen Präparaten lassen sich im Phasenkontrast auch geringe Brechzahlunterschiede gut erkennen und Dichteänderungen registrieren.
22. Dieser Monozyt ist zwar ebenfalls im positiven Phasenkontrast aufgenommen, aber mit einem einfachen Achromaten. Das geringe Auflösungsvermögen kommt in der flauen, unscharfen Abbildung zum Ausdruck.
23. Mit einem Neofluar ist das Bild schärfer und kontrastreicher. Es machen sich aber Überstrahlungen durch den hier sehr starken Haloefekt besonders störend bemerkbar.
24. Erst bei Verwenden von Achromaten und durch ihr höheres Auflösungsvermögen kommt es zur optimalen Darstellung überlebender Blutzellen im positiven Phasenkontrast.
25. Zum Vergleich noch einmal eine Aufnahme mit einem Achromaten. Die Strukturen des neutrophilen Granulozyten sind wieder schlecht aufgelöst, das Bild ist flau und unscharf.
26. Dieselbe Zellart, aufgenommen mit einem Achromaten. Das Bild ist jetzt scharf, alle Zellorganellen sind deutlich sichtbar und die Lichthöfe auf ein Minimum reduziert.
27. Unter optimalen Verhältnissen, also in Präparaten von etwa 3  $\mu\text{m}$  Höhe, im positiven Phasenkontrast und bei Verwenden von Achromaten mit höchstem Auflösungsvermögen, läßt sich der Abbildungsmaßstab, hier mit Hilfe des Optovars, sogar noch weiter heraufsetzen. Trotz geringer Übervergrößerung tritt kein bemerkenswerter Qualitätsverlust auf.

### **Literatur**

- [1] ENGEL, H.-J.: Ein Beitrag zum Bild des Leukozyten und seine filmische Darstellung. Res. Film. 5 (1966), 461—472.
- [2] GABLER, F.: Positiver oder negativer Phasenkontrast? Mikroskopie 10 (1955), 119—124.
- [3] HASELMANN, H.: Beiträge zur Phasenkontrast-Mikroskopie 1. Mitteilung: Praktische Methodik und kritische Betrachtungen. Mikroskopie 5 (1950), 214—224.
- [4] LANG, W.: Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie nach NOMARSKI. Zeiss-Informationen 18 H. 76 (1970), 69.
- [5] MICHEL, K.: Die Mikrophotographie, 3. Aufl., Bd. X der Reihe „Die wissenschaftliche und angewandte Photographie“. Hrsg. J. STÜPER, Springer-Verlag, Wien-New York (1967).

- [6] WILSKA, A.: Observations with the Anoptral Microscope. *Mikroskopie* 9 (1954), 1—45.
- [7] WITTE, S.: Intravital and Fluorescence Techniques in Clinical Cytology. *German Medical Monthly* Vol XIII (1968), 44—47.
- [8] ZERNIKE, F.: Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. *Z. techn. Phys.* 16 (1935), 454—457.
- 

### **Angaben zum Film**

Der Film wurde aus Forschungsaufnahmen zusammengestellt und 1972 veröffentlicht. Tonfilm, 16 mm, schwarzweiß, 86 m, 8 min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1972 mit Unterstützung durch das Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, im Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin, Prof. Dr. H.-J. ENGEL, REGINA SCHÜTZ. Bearbeitet und veröffentlicht durch das Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. K.-H. HÖFLING.

### **Inhalt des Films**

Es werden überlebende Blutzellen aus dem peripheren Blut des Menschen in verschiedenen gebräuchlichen mikroskopischen Durchlichtverfahren vergleichend dargestellt. Der Film zeigt Aufnahmen im Hellfeld, schiefen Hellfeld, Interferenzkontrast nach NOMARSKI und Dunkelfeld. Außerdem wird die Wirkung des negativen Phasenkontrasts nach WILSKA und die des positiven Phasenkontrasts nach ZERNIKE demonstriert.

### **Summary of the Film**

Comparative pictures are shown of surviving blood cells from human peripheral blood under a microscope with the use of various customary methods of transmitted light illumination. The film shows pictures taken in a bright field, oblique bright field, dark field, and with NOMARSKI interference contrast. The effect of WILSKA negative phase contrast and ZERNIKE positive phase contrast is also demonstrated.

### **Résumé du Film**

A l'aide de divers procédés de microscopie pénétrative, on a montré comparativement des cellules sanguines en survie provenant du sang périphérique de l'homme. Le film montre des vues sur fond clair, sur fond clair oblique, de microscopie à contraste interférentiel selon NOMARSKI et sur fond noir. En outre, on a démontré l'effet du contraste de phase négatif, selon WILSKA et celui du contraste de phase positif selon ZERNIKE.