



■ **Reflexionskontrast-Mikroskopie**

■ **Erhitzungsmikroskopie als Untersuchungstechnik zum Studium des Sinterverhaltens von Glas und Keramik**

■ **Drei neue LEICA DM L Routine- und Labormikroskope**

■ **Neues Mikrophotosystem LEICA DM LD**

Reflexionskontrast-Mikroskopie

von J. S. Ploem¹, I. Cornelese-ten Velde², F. A. Prins², J. Bonnet³, und E. de Heer²

¹Leiden University, ²Department of Pathology, Leiden University, ³Department of Cytochemistry and Cytometry, Sylvius Laboratories, Leiden University

Einleitung

In den Jahren 1964–1976 wurde über verschiedene Untersuchungen zur Sichtbarmachung von Zelle/Glas-Kontakten unter Anwendung der Auflichtmikroskopie berichtet [1, 20, 36, 48]. Diese Verfahren wurden als Interferenz-Reflexion, Reflexions-Interferenzkontrast, Oberflächenkontrast- und Oberflächenreflexions-Interferenzmikroskopie bezeichnet [64]. Um mit Hilfe dieser Mikroskopierverfahren den Bildkontrast zu erhöhen, wurden mehrere optische Ergänzungsmethoden von einem der Autoren dieses Berichtes untersucht [62, 63]. In Zusammenarbeit mit Leica Wetzlar [56, 57] wurde anschließend ein Mikroskopsystem entwickelt, das auf einer Kombination von Auflicht-Polarisation, mit hochaperturigen (N. A.) Immersionsobjektiven, mit einer Viertel-Lambdaplatt bestückten und einer, in einer konjugierten Apertur ebene im Auflichtstrahlengang befindlichen Zentralblende beruht. Diese optisch modifizierte Version der Reflexionsmikroskopie wurde als **Reflexionskontrast-Mikroskopie (RKM)** bezeichnet. Mit der RKM konnte eine beträchtliche Verbesserung der Bildqualität erreicht werden, welche die Beobachtung schwach reflektierender Mikrostrukturen und eine Photographie ganzer mikroskopischer Sehfelder erlaubt.

Die meisten der ersten Anwendungen waren auf die Beobachtung lebender Zellen ausgerichtet. Die Untersuchung von histologischen Routine-Schnitten war durch die komplexen Reflexionsbilder dieser relativ dicken Präparate beeinträchtigt. Durch die Untersuchung ultradünner Schnitte erreichte Cornelese-ten Velde [11, 12] eine signifikante Erweiterung der RKM-Anwendungen.

Dünne mikroskopische Präparate erleiden bei der mikroskopischen Bildentstehung keine Störungen durch die vor und hinter der Fokusebene befindlichen Bildstrukturen bei Präparaten, die nicht dicker als einige wenige Mikrometer sind. Die konfokale Mikroskopie jedoch, liefert auch meist eine Lösung dieser Probleme, da sie durch optische Eliminierung der Bilder vor und hinter der Brennebene eine dünne Schicht des Präparates sichtbar darstellen kann. Routine-Hellfeldmikroskopie ergibt bei dünnen Schnitten kein befriedigendes Bild, da, leider, eine Präparatdicke von mindestens 2 µm erforderlich ist, um hinreichenden Kontrast für die meisten histologischen Färbungen zu erzielen. RKM ergab ausreichenden Kontrast, selbst mit nur 35 nm dicken Schnitten. Der Grund hierfür liegt in der Licht-

reflexion als Oberflächenphänomen: Licht wird an jeder Grenzfläche von zwei Substanzen mit unterschiedlichen Brechungsindizes reflektiert, und die Reflexion hängt ab vom Unterschied im Brechungsindex der Färbung und ihrer Umgebung. Bonnet (pers. Mitteilung), Cornelese-ten Velde und Prins [14], und Prins et al. [65, 66] machten die bedeutende Feststellung, daß viele (immunologische Marker wie Peroxidase-generierte) Diaminobenzidinpolymer-Produkte (DABox), Immunogold (-silber), Gold/Silber Partikel und die Färbungsprodukte der alkalischen Phosphatase in dünner Schicht starke Reflexion zeigen. Daher vermag die Reflexionskontrast-Mikroskopie sehr dünne Schnitte in einem mit einer Auflichtbeleuchtung ausgerüsteten Mikroskop sichtbar zu machen. Moderne, hochqualifizierte Routinemikrotome, die in den meisten Laboratorien vorhanden sind, können 0,25 Mikrometer dicke Plastik-Semidünnschnitte herstellen, welche einen zufriedenstellenden Kontrast im RKM zeigen (Abb. 1a). Eine noch bessere RKM-Darstellung kann man mit ultradünnen (50–100 nm) Epon-, Lowicryl- und Kryoschnitten erreichen (Abb. 1b–d und 17b). Die dann gewonnene Bildauflösung liegt nahe der theoretischen Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops. Soweit es den Bildkontrast und die räumliche Auflösung betrifft, sind diese Bilder mit die besten, die man in der Lichtmikroskopie erreichen kann.

Im Reflexionskontrastmikroskop können viele konventionelle histochemische Färbungen und immunologische Marker in dem gleichen Mikroskopfeld simultan beobachtet werden und damit leistungsfähige morphologische und cytochemische Diagnosemöglichkeiten eröffnen. Aus diesem Grunde sollte die Einführung moderner benutzerfreundlicher Ultra(kryo)mikrotome in die Routinelabors ins Auge gefaßt werden. Ein Herstellen von semidünnen (Plastik-)Schnitten mit einem Routinemikrotom jedoch, ist für viele Immunodiagnostische Routineverfahren in der Pathologie ausreichend. Der Vorteil der Reflexionskontrast-Mikroskopie in der Biologie und der Diagnostik ist der, daß RKM eine bessere Darstellung der Markierung auf oder in der Zelle bzw. im Gewebe gestattet und somit zu einer gesteigerten Detektionsempfindlichkeit führt. Durch Anwendung der RKM können selbst kleine Ansammlungen von (15 nm) Goldpartikeln direkt sichtbar gemacht werden, währenddem diese mit Hilfe der normalen Licht-

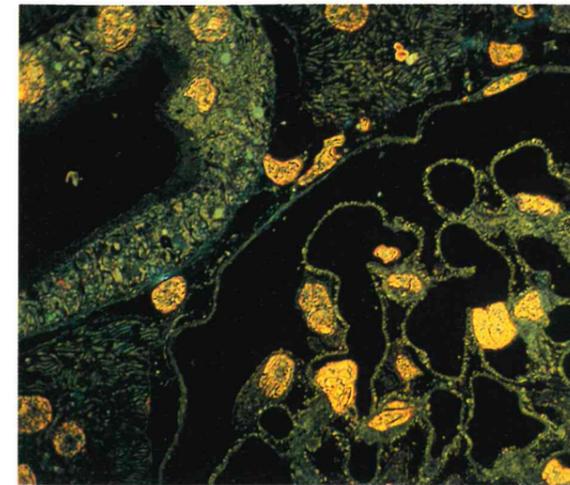


Abb. 1a: 0,25 µm dicker LR White-Schnitt einer Rattenniere, gefärbt mit Hämatoxylin.

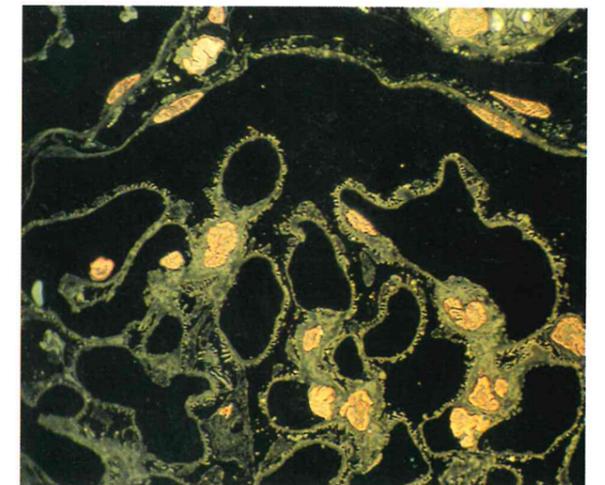


Abb. 1b: Ultradünner LR White-Schnitt einer Rattenniere, gefärbt mit Hämatoxylin, gleiches Gewebe wie 1a.

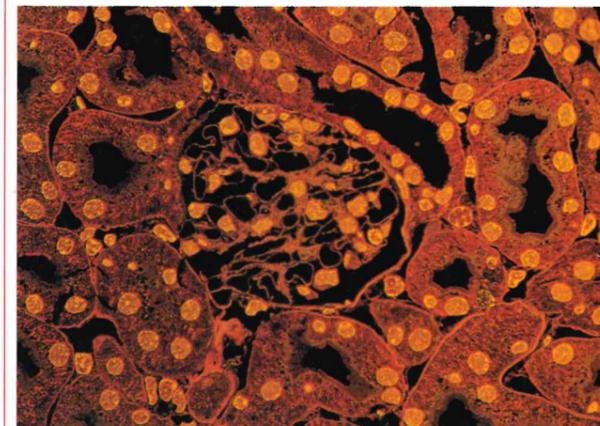


Abb. 1c: Ultradünner Kryoschnitt einer Rattenniere, gefärbt mit Lichtgrün.

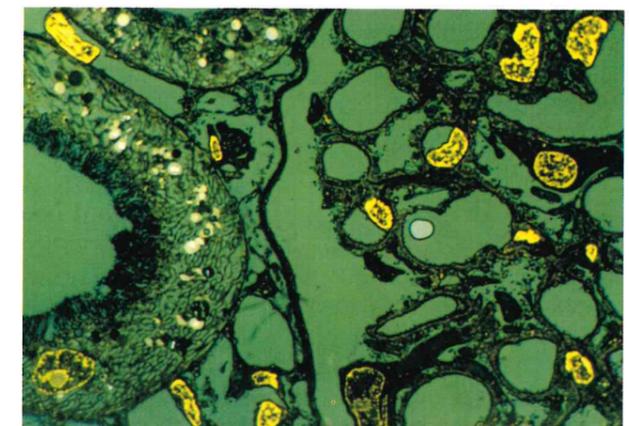


Abb. 1d: Ultradünner Lowicrylschnitt der Rattenniere, aufgezogen auf einen mit Gelatine beschichteten Objektträger [14], gefärbt mit Hämatoxylin.

mikroskopie nur nach Silberverstärkung detektierbar sind [14]. Der Reflexionsgrad von Immunogold-Silber im RKM ist doppelt so groß als das Depolarisations-Signal, das man mit Auflicht-Polarisationsmikroskopie erreicht [13]. Kürzlich zeigten *in situ*-Hybridisierungsstudien mittels Multicolor-RKM die Detektion von Mehrfach-Immuno-markern [70].

Die ersten Optikauteile, die für die Reflexionskontrast-Mikroskopie von Leitz produziert wurden, waren für die Verwendung mit Endlich-Optik vorgesehen und sind nicht mehr erhältlich. Von Leica Wetzlar werden derzeit neue RKM-Ölimmersionsobjektive für Unendlich-Strahlengang entwickelt. Mit diesen Objektiven und ein paar Zusatzbauteilen für RKM wäre es dann sehr einfach, ein modernes Fluoreszenzmikroskop auf der Basis LEICA DMR-Stativ entsprechend auszurüsten: 1. Ein Ölimmersi-

onobjektiv mit $\lambda/4$ -Platte; 2. ein in den Auflicht-Beleuchtungsstrahlengang einsetzbares Modul, das den Einschub eines Schiebers mit verschiedenen Zentralblenden gestattet; 3. ein in den Fluoreszenzilluminator einsetzbaren Polarisator-Block. – Wenn derart für die Reflexionsmikroskopie ausgestattet, können weiterhin die üblichen Mikroskop-Funktionen wie Hellfeld und Fluoreszenz genutzt werden und somit die Anwendung dieser drei Hauptfunktionen für das gleiche Bildfeld vom Präparat ermöglichen (Tab. 1).

Tabelle 1: Mikroskop für Reflexionskontrast-Mikroskopie.



I

Ein solches Mikroskop, z. B. ein LEICA DM RX-Stativ (Abb. I) sollte mit den folgenden Bauteilen bestückt sein:

1) RKM-Ölimmersionsobjektiv (N PLAN 100 x/1.25 Oil RC) mit vorgefaßter Viertelwellenlängenplatte (Abb. II). Die $\lambda/4$ -Platte ist drehbar, um die maximale Reflexion des cytochemischen Markers im Präparat einzustellen. In diesem Falle ist die Polarisationssebene des reflektierten Lichtes optimal für sein Passieren durch den Analysator.

2) Fluoreszenz-Illuminator mit auswechselbaren Filterblocks für Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie. Einzusetzen sind ein POL-Filterblock mit Polarisator, ein neutraler Strahlenteiler und ein Analysator (Abb. III).

3) Reflexionskontrast-Modul RC, einzusetzen in den Auflicht-Strahlengang des DM RX-Stativs (Abb. IV). Dieses Modul besitzt zwei Schieber, einen mit verschiedenen Zentralblenden und einen mit unterschiedlichen Apertur-Lichtringen. Beide zusammen ermöglichen die RKM-Beleuchtung mit verschiedenen Aperturen und Einfallswinkeln, wie von Bereiter-Hahn et al. [3] empfohlen. Bei Einstellung der Schieber auf eine leere Position, ist Fluoreszenzmikroskopie mit den geeigneten, selektierbaren Filterblocks des Fluoreszenz-Illuminators möglich.

4) Lampenhaus mit Hg-Höchst- oder Xenonlampe, wie in der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie möglich.



II



III



IV

Reflexionskontrast-Mikroskopie, eine historische Übersicht

Reflexionsmikroskopie von biologischen Objekten

Fauré-Fremiet [26] beobachtete schon vor einem halben Jahrhundert die Morphologie von Zellen auf Glas im auffallenden Licht. Curtis [20] war der erste, der grundlegende Untersuchungen der Haftzonen von lebenden Zellen auf Glasoberflächen durchführte. Er definierte diese Methode als Interferenz-Reflexions-Mikroskopie. Ferner untersuchten Lochner und Izzard [48] die Grundprinzipien der Bildentstehung während der Beobachtung von lebenden Zellen. Reflexionsbilder erhielt man auch mit Scanning-Verfahren [7, 60].

Bei der herkömmlichen optischen Mikroskopie im reflektierten Licht ist das an den oberen und weiteren Linsenflächen des Objektivs reflektierte Licht hauptsächlich verantwortlich für das in der Abbildung unerwünschte Streulicht, was zu einem reduzierten Bildkontrast führt. Bei transparenten biologischen Präparaten wird auch Licht von der Unterseite des Objektträgers reflektiert. Um bei der Auflichtmikroskopie von Kohlen das Reflexions-Streulicht zu reduzieren, entwickelte Stach [71] Aperturblenden

mit Zentralausblendung. Piller [61] führte in der Auflichtmikroskopie von Kohlen das Antiflex-Prinzip ein. Hierzu wird ein niedrigvergrößerndes Ölimmersionsobjektiv mit einer Viertelwellenlängenplatte versehen, die auf der Frontlinse des Objektivs angebracht ist. Linear polarisiertes Licht wird in einem Auflichtilluminator geführt und dort durch einen neutralen Strahlenteiler zum Objektiv hin abgelenkt. Das von den Linsenflächen reflektierte Licht wird durch einen 90° zum Polarisator gekreuzten Analysator gesperrt. Die von der Objektträgeroberfläche reflektierten Lichtstrahlen passieren die $\lambda/4$ -Platte an der Objektiv-Frontlinse zweimal, wodurch die Polarisationssebene dieses Lichtes um $2 \times 45^\circ = 90^\circ$ gedreht wird und es damit den Analysator zum Okular hin passieren kann. Mit der Antiflex-Ausrüstung kann im Prinzip nur das in der Präparatenebene reflektierte Licht zur Bildentstehung beitragen.

Einführende Literatur zur Reflexionskontrast-Mikroskopie

Westphal [78] erörtert die allgemeinen Grundlagen der Bildentstehung bei der klassischen Auflichtmikroskopie für die biologischen Anwendungsfälle. Verschueren [77] behandelt die Methoden und Anwendungen der Auflichtmikroskopie in der Zellbiologie. Für einen Überblick über

die frühe Entwicklung reflexionsmikroskopischer Verfahren, sollte das Kapitel über Reflexionskontrast-Mikroskopie von Pluta in seinem Handbuch »Advanced Light Microscopy« (1989) herangezogen werden. Eine weitere Abhandlung der Reflexions-Mikroskopie, zusammen mit Berichten zu ihrer eigenen Forschung über RKM, wurde von Cornelese-ten Velde in einer Dissertationsarbeit veröffentlicht [11]. Prins et al. [65, 66] diskutierten und veröffentlichten Untersuchungen über immunocytochemische Studien an Ultradünnschnitten. Dieser Art des Einsatzes stellt eine der vielversprechendsten Anwendungen der Reflexionskontrast-Mikroskopie dar, und dies wird möglicherweise zu einer weiteren, bedeutenden Verbesserung der Bildauflösung in der Immunocytochemie führen.

Optische Anordnung

Für die biologische Forschung schlug Ploem [62, 63] in Zusammenarbeit mit Leitz Wetzlar (heute Leica Wetzlar) [56, 57] folgende optische Anordnung vor (Abb. 2):

- I. Hochaperturige Ölimmersions-Objektive mit vorgefaßter $\lambda/4$ -Platte. Leica (Leitz) war der erste Hersteller, der derartige Objektive (40 x (später 50 x) und 100 x Ölimmersionsobjektive für RKM) konstruierte, um die Untersuchung biologischer Objekte bei hoher Auflösung zu ermöglichen. Zeiss (Oberkochen) fertigte ein Antiflex-Immersionsojektive 63 x. Die $\lambda/4$ -Platte ist drehbar, so daß die Reflexion vom Präparat auf den Maximalwert eingestellt werden kann. Damit ist die Polarisationssebene des reflektierten Lichts für das Passieren des Analysators in optimaler Position; es kann nun die Reflexionskontrast-Mikroskopie durchgeführt werden. Wenn die $\lambda/4$ -Platte auf Minimalreflexion eingestellt wird, ist Auflicht-Polarisationsmikroskopie möglich.
- II. Die Ausrüstung eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskops mit einem Linsensystem vor dem Lampenhaus,

um den Zugriff zu einer mit der oberen Eintrittspupille des Objektivs konjugierten Apertur ebene zu schaffen. Dies erlaubt hier das Einbringen von speziellen Aperturblenden mit Zentralausblendung, die genauestens auf die Eintrittspupille des ausgewählten Objektivs ausgerichtet sind. Heutige Forschungsmikroskope von Leica (LEICA DM R) gestatten in ihrer Grundausstattung für Auflichtmikroskopie ein einfaches Einsetzen verschiedener Zentralblenden in ein Modul. Es erwies sich als notwendig, für die RKM-Visualisierung von cytochemisch gefärbten biologischen Objekten eine Zentralblende zuzuschalten, wenn sehr geringe Reflexionen erkannt werden sollten. Wegen der Transparenz dieser Objekte durchdringt der größte Anteil des auffallenden Lichtes den Objektträger und wird an der unteren Seite des Glases, wo eine beträchtliche Brechzahl-differenz auftritt, reflektiert. Dies führt zu viel unerwünschtem Licht im Bildhintergrund wenn keine Zentralblende im Beleuchtungssystem sich befindet. Die Funktion des Zentralblendensystems sowie alternative optische Lösungen zur Reduzierung unerwünschten Reflexionslichtes wird von Cornelese-ten Velde et al. ausführlich diskutiert [13].

III. Der Austausch eines Filterblocks im Fluoreszenz-Auflichtilluminator, der normalerweise dichromatische Spiegel enthält, gegen einen Block mit normalem Strahlenteiler, einem Polarisator und einem Analysator.

Für die gesamte optische Anordnung, welche eine Reflexions-Mikroskopie mit minimalem Anteil von unerwünschtem reflektiertem Streulicht zum Ziel hat, wurde die Bezeichnung »Reflexionskontrast-Mikroskopie« vorgeschlagen.

Lebende Zellen

Eine der frühen Anwendungen von Reflexions-Mikroskopie in der Biologie befaßt sich mit dem Studium des Haftens von lebenden Zellen an einer Glasoberfläche (Abb. 3) [1, 20, 36, 48, 62, 63]. Die Bildentstehung bei Zellen, die

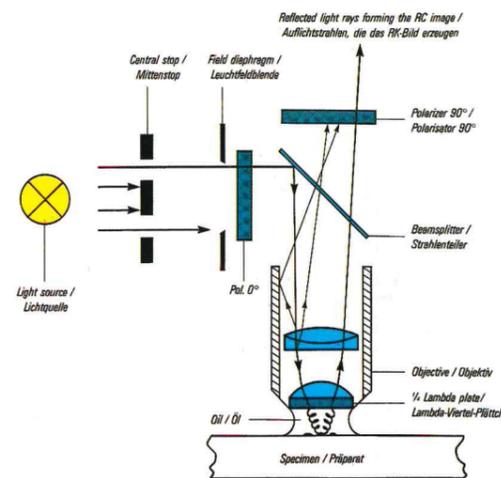


Abb. 2: Prinzip der Reflexionskontrast-Mikroskopie.



Abb. 3: RKM-Bild lebender Zellen durch das Deckglas gesehen, an das die Zellen der Nierentumor-Zelllinie SK-RC-52 (Gural) angeheftet sind.

einem Glas-Objektträger anhaften, wurde von Pluta [64] diskutiert. Abb. 4 zeigt im Schema einen vertikalen Schnitt durch eine lebende Zelle auf einem Deckglas. Eine hohe Reflexion tritt an der Glas/Medium-Grenzfläche auf, an der eine relativ große Brechzahlendifferenz vorhanden ist. Die Glas/Zelle-Oberflächenkontakte zeigen den geringsten Brechzahlunterschied und ergeben einen sehr geringen Reflexionsgrad. Falls eine dünne Schicht des Mediums (z. B. unter der Zelle) vorhanden ist oder eine dünne Plasmaschicht, treten an der Ober- und Unterseite dieser Schichten Reflexionen auf. Wenn die Dicke der Schicht in der Größe der Lichtwellenlänge liegt, dann sieht man im mikroskopischen Bild aufgrund der Interferenz dieser reflektierten Lichtstrahlen Interferenzringe. Es wurden mehrere Aspekte der Bildentstehung in der Reflexionskontrast-Mikroskopie untersucht, wie der Einfluß konischer Beleuchtung, die Größe der Aperturblende und die Dicke der Zelle oder der zellulären Strukturen [1-3, 20, 29, 30, 36, 48]. Reflexionskontrast-Mikroskopie wurde angewandt im Vergleich und in der Kombination mit anderen mikroskopischen Methoden, wie differenzielle Interferenzkontrast-Mikroskopie, Hochspannungs-Elektronenmikroskopie, Immunofluoreszenz-Mikroskopie, Immuno-Elektronenmikroskopie, Raster-Elektronenmikroskopie [31, 40], Phasenkontrast-Mikroskopie und »total internal reflection aqueous fluorescence« [73]. Andere Studien berichten über die Beziehung zwischen Adhäsionsmustern und/oder Ca^{2+} -Konzentrationen und Fortbewegung [17, 24, 37, 39, 43, 72], über die Assoziation des Mikrofilamentsystems (Mikroskelettsystems) mit der Zellhaftung [28, 33] und über die Beziehung zwischen Zellhaftung und Malignität [16, 18, 32, 67].

Bildentstehung

Die Bildentstehung von Objekten im Reflexionskontrast-Mikroskop wird mit 2 Grundphänomenen erklärt, d. i. Interferenz von reflektierten Lichtstrahlen und selektive Reflexion. Selektive Reflexion von Licht kann als Reflexion bestimmter Wellenlängen vermittels einer Substanz

mit hoher Absorption und hohem Brechungsindex für diese Wellenlängen definiert werden. In der Auflichtmikroskopie zeigen gefärbte Präparate im allgemeinen die Komplementärfarbe des konventionellen Durchlicht-Bildes; z. B. sieht man eine aufgrund der Absorption der roten Wellenlängen im Durchlicht blau gefärbte Struktur im Auflichtbild rot. Es werden also die gleichen Wellenlängen, die absorbiert wurden, reflektiert.

Interferenz von reflektiertem Licht pflegt in den Reflexionskontrast-Bildern ungefärbter Präparate eine dominierende Rolle zu spielen, wohingegen selektive Reflexion als der dominierendere Modus bei gefärbten Präparaten vorausgesetzt wird [76]. Diese beiden unterschiedlichen Grundphänomene können unterschiedliche Informationsinhalte liefern. Interferenz von reflektiertem Licht gibt eine Information über den Zwischenraum zwischen Zelle und Substrat (z. B. Glas-Oberfläche) oder ganz allgemein über die Abstände zwischen reflektierenden Grenzflächen. Selektive Reflexion kann Färbungen (/Substanzen) mit speziellen Reflexionseigenschaften im Bild hervorheben (meist intensiver als in der Durchlichtmikroskopie). Der resultierende, verstärkte Bildkontrast kann die Lokalisierung des cytochemischen Färbeproduktes erleichtern.

Es gibt zwei Methoden, um zwischen diesen beiden Phänomenen zu unterscheiden, nämlich entweder auffallendes Licht verschiedener Wellenlängen oder unterschiedliche numerische Beleuchtungsaperturen zu benutzen [3]. Die Tatsache, daß beide Phänomene simultan auftreten und beide zur Bildentstehung vom gleichen Objekt beitragen können, war nicht so sehr bekannt; sie erwies sich aber als ein Fall für die DABox-Detektion [12].

(Immun)cyto- und histochemisch gefärbte Chromosomen, Zellen und Gewebe

Die mit RKM erhaltenen Bilder gefärbter Präparate kann man mit Hilfe der beiden oben genannten Phänomene verstehen oder auf der Grundlage von Reflexions-Erscheinungen, wie sie durch optische Grundprinzipien beschrie-

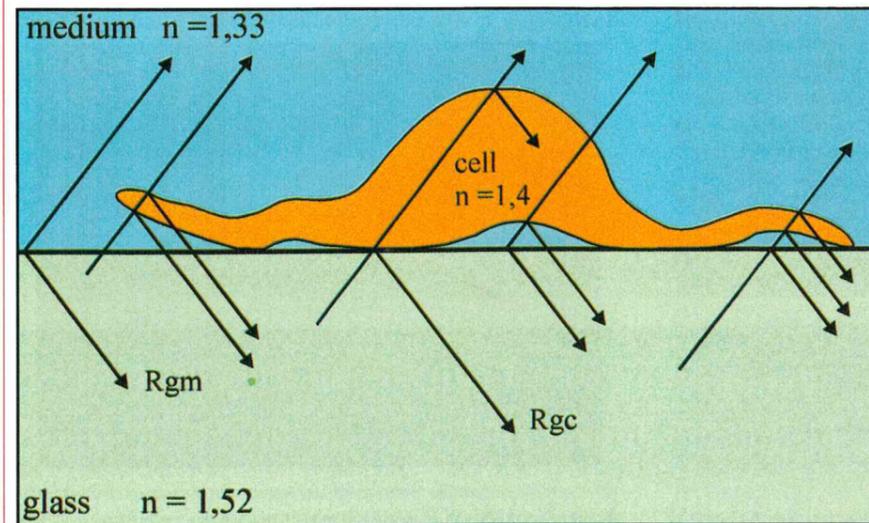


Abb. 4: Schemazeichnung der Reflexion von Lichtstrahlen an Zellen, die in einem wässrigen Medium an einem Glassubstrat anhaften (nach Pluta [64]). Rgm = Reflexion an der Glas/Medium-Grenzschicht; Rgc = Reflexion des Glas/Zelle-Kontaktes.

ben sind, erklären. Die Reflexion des Lichtes an einer Grenzfläche mit gegebenem Brechungsindex n und einem Absorptionskoeffizienten k wird durch die Fresnel-Gleichungen beschrieben. Die Bilder kann man durch Anwendung dieser physikalischen Gesetze auf die gefärbte subzelluläre Struktur der Präparate deuten. Die physikalischen Eigenschaften n und k von Farbstoffen können durch den pH-Wert, die Salzkonzentration und ihre Konstellation (kristalline oder amorphe Präzipitate) beeinflusst sein oder durch die chemischen Bindungen oder elektrostatischen Kräfte, die während der Präparation auftreten können. Interferenz der Reflexion (nur Unterschiede in n) und selektive Reflexion (hoher Wert für k) können beide auftreten, wenn der Farbstoff sich in einer Schicht befindet, die eine Interferenz der selektiv reflektierten Lichtstrahlen entstehen läßt. Ein Unterscheiden von reiner Selektiv-Reflexion bzw. Interferenz der Reflexion von Farbstoffen ist nicht angebracht, da die Konstellations-Charakteristika und die physikalischen Eigenschaften n und k des Farbstoffes beide die Bildentstehung bestimmen.

In einem vereinfachten Ansatz können in gefärbten Präparaten drei Arten von Reflexionslicht im Reflexionskontrast unterschieden werden:

- 1) Depolarisiertes reflektiertes Licht von metallischen (und doppelbrechenden – d. i. kristallinen oder geordneten Chromophoren-)Substanzen.
- 2) Selektivreflexion und
- 3) helle und dunkle (oft farbige) Interferenzstreifen bzw. -ringe.

Zu 1). Silberverstärkte Immunogold-Partikeln werden charakteristischerweise mit Auflicht-Polarisationsmikroskopie untersucht. Da die Viertelwellenlängenplatte eines RKM-Objektives drehbar ist, kann man eine optische Einstellung wählen, die der optischen Konfiguration der Auflicht-Polarisationsmikroskopie entspricht. Wenn jedoch die $\lambda/4$ -Platte des RKM-Objektives auf maximale Helligkeit gedreht wird, kann eine Zweifach-Intensitätssteigerung des von den silberverstärkten Immunogold-Partikeln reflektierten Lichtes erreicht werden [13]. Da solche Bilder oftmals dem menschlichen Auge sehr hell und der Hintergrund abgeschwächt erscheinen, ist eine Gegenfärbung des Gewebes zu empfehlen.

Zu 2). Selektive Reflexion von Licht resultiert im allgemeinen, gegenüber den bekannten Absorptionbildern, in komplementär gefärbten Abbildungen (wie oben beschrieben).

Zu 3). In cytochemisch gefärbten Präparaten tragen bei RKM-Bildern die Interferenz-Erscheinungen meist nicht zur Information bei. Die Verschlechterung der gesamten Bildqualität, die von Interferenzfiguren verursacht werden können, ist durch Herstellung semi- oder ultra-dünner Schnitte eingrenzbar.

In der Reflexionskontrast-Mikroskopie cytochemisch gefärbte Präparate erhält man oft sehr starken Bildkontrast. Manchmal kann dies Fluoreszenzbilder vortäuschen. Van der Ploeg und van Duijn [75, 76] schließen daraus, daß einige in der Literatur beschriebene Beobachtungen als Fluoreszenzen angefärbter Strukturen gedeutet werden

[68], in Wirklichkeit aber auf Selektiv-Reflexion beruhen.

Vor 1985 etwa, war die Hauptaufmerksamkeit der Forscher auf die Anwendung von RKM bei nicht-immunologischen Färbungen gerichtet. Pera [58, 59] studierte Hämatoxylin/Eosin-gefärbte histologische und cytologische Schnitte. Er bemerkte, daß beim Drehen der Viertelwellenlängenplatte auf maximale Helligkeit, wie es für RKM geschieht, ein verstärkter Farbkontrast bei schwach gefärbten Präparaten erhalten wurde, die mit konventioneller Mikroskopie nur gerade eben erkennbar waren. Auch wurde von einer Verbesserung der Cytoskelett-Abbildung berichtet, wenn man Zellen mit Coomassie-Blau [55] und anderen Farbstoffen unspezifisch anfärbte. Reflexionsbilder von verbesserter Brillanz und Auflösung, verglichen mit Phasenkontrast und konventioneller Mikroskopie, wurden (auch [68, 75]) von Lejeune [47] bei Giesma-gefärbten Chromosomen erhalten. Wegen der relativ komplexen Bildentstehung im RKM ist es immer wichtig, die Art des reflektierten Lichtes zu bestimmen, um irrtümliche Schlußfolgerungen zu vermeiden [75, 76]. Durch Wechsel der Wellenlänge des auffallenden Lichtes und der numerischen Apertur (wie von Bereiter-Hahn et al. beschrieben [3]), konnten Opat und Kalnins [54] nachweisen, daß beispielsweise der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau hauptsächlich Selektiv-Reflexion zeigt.

Eine bedeutsame Erweiterung der RKM-Anwendung wurde 1982 durch die Beobachtung von Bonnet (unveröffentlicht) geschaffen, wonach oxydiertes polymerisiertes Diaminobenzidin (DABox), das Endprodukt einer Immunoperoxidase-Färbung, ein starkes Reflexionsvermögen zeigt. Dieser Befund wurde benutzt, um eine nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung mit Peroxidase-DAB als Marker und RKM als mikroskopische Nachweistechnik durchzuführen [44, 45] (Abb. 5). Dies ergab die erste erfolgreiche Detektion eines eindeutigen Gens auf einem menschlichen Metaphasechromosom. Eine weitere Erforschung der Reflexionskontrast-Mikroskopie immunocytochemisch gefärbter Zellen wurde an Hand einer genauen Untersuchung aller Parameter, die an der Bildentstehung bei dieser neuen Anwendung mitbeteiligt waren, erreicht [12]: Eine kombinierte theoretische und praktische Forschungsarbeit zeigte, daß die Bildentstehung der DABox-Reflexion mehr auf Interferenz der Reflexionen basierte als

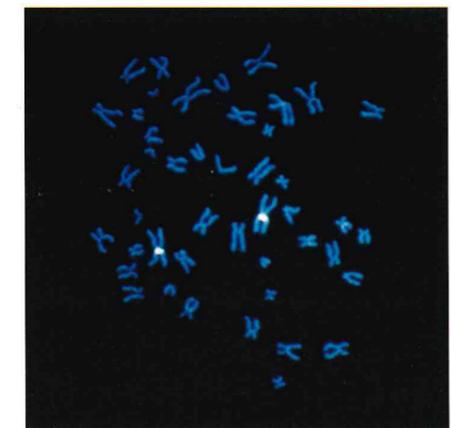


Abb. 5: Nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung einer Maus-Metaphase, mit biotinyliertem pUC 1,77 und detektiert mit der Peroxidase-DAB-Methode [45].

auf Reflexionen aufgrund von Absorptionseigenschaften. Weil die Reflexion von DABox primär von seiner Schichtdicke (die auf 50–100 nm für eine sensitive Detektion von DABox durch RKM geschätzt wurde) abhängig ist, wurden die Restriktionen für ein Präparat zur Ausnutzung der kontraststeigernden Eigenschaften der RKM deutlich: der Farbstoff muß in einer ultradünnen Schicht vorliegen. Daher lieferten ultradünne Epon-Schnitte, DABox enthaltende oder mit Immunoperoxidase gefärbte Lowicryl-Schnitte optimale Abbildungen im Reflexionskontrast-Mikroskop – und ein neues Anwendungsfeld war aufgetan [12]. Die Reflexionskontrast-Mikroskopie immunocytochemisch gefärbter Ultradünnschnitte wurde in Pionierarbeit vom Department of Cytochemistry und, von 1989 an, vom Department of Pathology der Universität Leiden/Niederlande untersucht. Diese Ultradünnschnitte lieferten extrem scharfe mikroskopische Abbildungen, welche die theoretische Auflösungsgrenze des Mikroskops erreichten [11–15, 66]. Solche Präparate sind im normalen Hellfeldmikroskop vollständig transparent. An Zellen wurde ein starkes Reflexionsvermögen von Immunogold und silberverstärktem Immunogold nachgewiesen [34]. Cremers et al. [19] vergleichen nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierungen im Reflexionskontrast- und Elektronenmikroskop. Die Anwendung der konfokalen Laser-Scanningmikroskopie im Auflicht (Reflexion) ergab einen hohen Reflexionsgrad von DABox und dem Reaktionsprodukt der alkalischen Phosphatase bei Verwendung von Naphtol-AS-Phosphat als Substrat und Fast Blue BB als Koppler [6, 69]. Speel et al. [70] zeigten als erste den Gebrauch vielfach reflektierender Immunmarker bei *in situ*-Hybridisierungsstudien

(Abb. 6). Dieses erlaubt die Verwendung mehrerer Marker z. B. für genetische Studien (Tab. 2). Die Behandlung der Präparate ist von Wichtigkeit: Eine kleine Menge von Rinderserumalbumin-Fixativ wird über die Objektträger ausgestrichen (um einen dünnen Protein-Schutzfilm zu erhalten), damit ein Auflösen der gefärbten Immunreaktionsprodukte im Immersionsöl, das auf das unbedeckte Präparat aufgebracht werden muß, zu vermeiden und die RKM zu ermöglichen.

Eine weitere Verbesserung des Bildkontrastes kann man sogar durch eine computerunterstützte Farbumwandlung digitalisierter RKM-Bilder mittels graphischer Softwareprogramme erreichen. Ein Bildwandlungs-Beispiel zeigt Abb. 7.

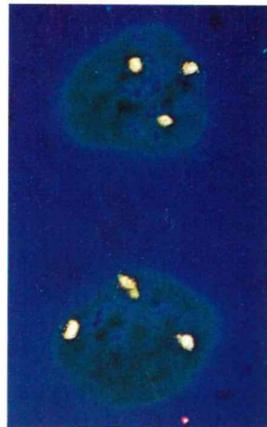


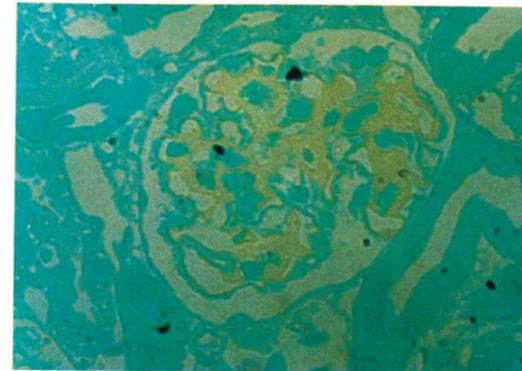
Abb. 6: Nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung in T24-Zellen (menschliche Übergangskarzinom-Zelllinie) mit biotinyliertem pUC 1,77, detektiert mit der Alkalischen-Phosphatase-Fast-Red-Methode [70].

Tabelle 2: Reflektierende Reaktionsprodukte bei immunocytochemischer Färbung.

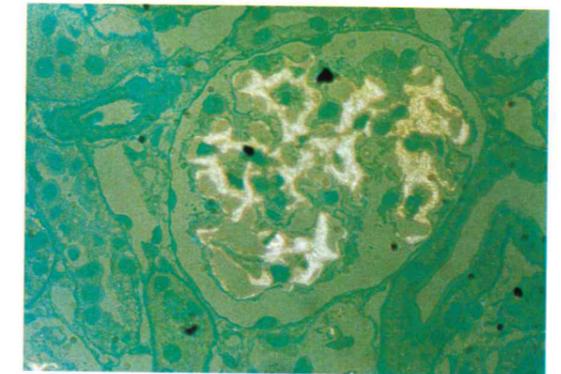
Method	Reagents	Brightfield	Reflection	Fluorescence
Conjugate				
PO	H ₂ O ₂ + DAB	brown	white	
PO	H ₂ O ₂ + AEC	red	yellow*	
PO	H ₂ O ₂ + TMB	green/purple	red/yellow	
PO	H ₂ O ₂ + Chloronaphtol	purple	white/yellow*	
APase	N-ASM-X-P + Fast Red TR	red	yellow*	red
APase	N-ASM-X-P + New Fuchsin	red	yellow*	red
APase	NBT/BCIP/INT	brown	white*	
APase	NBT + BCIP	blue/purple	orange/yellow*	
IGS	colloïdal gold (10–40 nm)	light pink	gold	
IGSS	colloïdal gold (1–5 nm) silver enhanced	black	white	
Autoradiography	silver grains	black	white	

PO – horseradish peroxidase
APase – alkaline phosphatase
IGS – immunogold staining
IGSS – immunogold silver staining

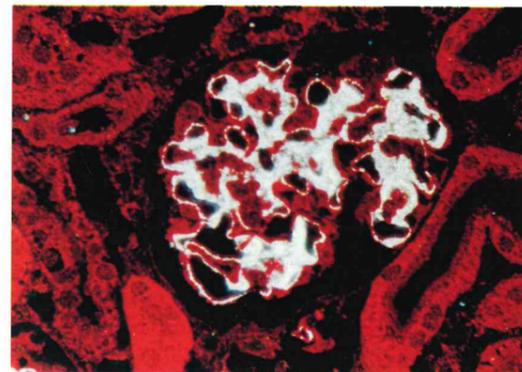
* Fixation of enzyme precipitates in a protein matrix is essential; mounting in immersion Oil.
Method of fixation:
Smear air-dried slides with protein-fixative mixture, containing 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA) and 2% glutaraldehyde and air-dried.



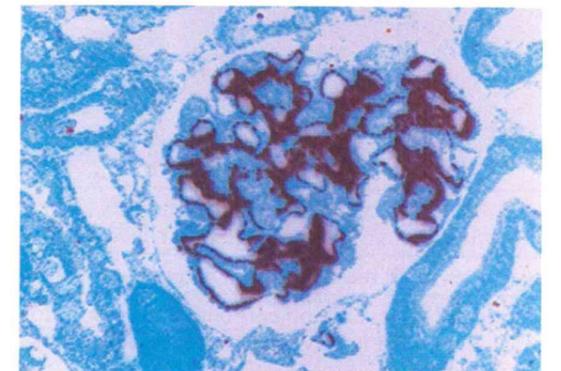
7a



7b



7c



7d

Abb. 7: Lokalisation von Immun-Deposits in der Nephrologie. Immunglobulin G-Ablagerungen im Glomerulus einer Maus mit Graft Versus Host Disease-induzierter Lupus-Nephritis, sichtbar gemacht durch eine indirekte Immunoperoxidase-Markierung; a–d: gleicher, 1 µm dicker Schnitt, gegengefärbt mit Lichtgrün, a) im Hellfeld, b) im kombinierten Durch- und Auflicht, Hellfeld/RKM, c) im Reflexionskontrast, d) im invertierten Computerbild von c: das digitalisierte Bild von c wurde lediglich invertiert, daher keine Farb- und Helligkeitsverstärkung.

Herstellung der Präparate

Semidünne oder ultradünne Präparate sind für die Reflexionskontrast-Mikroskopie am besten geeignet. Die meisten modernen Routine-Mikrotome, besonders wenn sie mit einem Glasmesser ausgerüstet sind, sind für RKM sehr brauchbar. Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie können unter Benutzung einer Drahtöse direkt vom Diamant- oder Glasmesser auf einen sauberen Objektträger gebracht werden. Ebenso kann man Kryo-Ultradünnschnitte direkt auf den Mikroskop-Objektträger übertragen [74]; sie strecken sich dort sehr gut [65]. Das RKM-Ölimmersionsobjektiv wird unmittelbar in das Immersionsöl eingetaucht. Falls mehrere Farbmarder am gleichen Präparat verwendet werden – so wie bei *in situ*-Hybridisierungs-Studien [70], können sich die verschiedenen gefärbten Endprodukte im Öl auflösen. Daher ist es ratsam, das Präparat mit einem dünnen Film aus Protein-Fixativlösung zu bedecken. Wegen der erhöhten Detektionsempfindlichkeit der RKM ist dieses Verfahren gegen alle Arten von Kontamination, wie Staubpartikel und innere Artefakte

[15, 70] sehr empfindlich. Daher müssen alle Lösungen zur Behandlung und Färbung der Schnitte über 0,2 µm-Filter filtriert werden (Schleicher & Schüll, FP030/3).

Anwendungen – eine Übersicht zur derzeitigen Forschung mit Reflexionskontrast-Mikroskopie

In der Pathologie werden immunhistologische Untersuchungen mit dem normalen Lichtmikroskop oft durch das nicht immer ausreichend sichtbare morphologische Detail und den geringen Kontrast von Marker-Substanzen beeinträchtigt – sowohl bei Paraffinschnitten als auch bei Gefrierschnitten. Wenn konventionelle Techniken unzureichende Informationen liefern, um Schlußfolgerungen zu ziehen, wird die Immuno-Elektronenmikroskopie erforderlich.

Für eine bestimmte Zahl der Probleme stellt die Lichtmikroskopie mit dem Reflexionskontrastmikroskop eine adäquate Lösung dar. Manchmal liefert eine Kombination von RKM mit (Immuno-)Elektronenmikroskopie optimale

Informationen. Für verschiedene Präparat-Typen, z. B. Zellkulturen, Biopsien, etc., sind verschiedene Verarbeitungsmethoden, Vor- und Nach-Einbettung in Plastik und Ultra-Kryotechniken erforderlich. Bezüglich der Beschreibung dieser Methoden wird der Leser auf Cornelese und Prins [14] und Prins et al. [65, 66] verwiesen. Eine Auflis-

stung der Anwendungsmöglichkeiten der RKM, welche aus gemeinsamen Untersuchungen in unseren Labors hervorgingen, mit den Abbildungen 8–20 und einer Zusammenfassung in den Tab. 3–5 dargestellt.

Im folgenden werden einige Beispiele von auf der RKM-Technik beruhender Untersuchungen mitgeteilt.

Tabelle 3: Prinzip-Schema der Reflexionskontrast-Anwendungen.

Subject	Original Method	Literature
immunolocalization studies at (sub)cellular level in cells and tissues*	LM, FM, IEM	[5, 10, 21, 22, 27, 38, 41, 46, 65]
in-situ hybridization	LM, FM, EM	[19, 35, 44, 45, 49–51, 70]
autoradiographic detection	darkfield microscopy, epipolarization microscopy	[4]
attachment and movement of living cells	reflection microscopy	[2, 3, 32, 39, 40, 43, 63, 72]
tracer studies of molecules conjugated with a label (radioactive, PO, gold or indirect with a labelled antibody)	autoradiography LM, FM, IEM	[52, 53]
detection of small inclusions, fragmented foreign material	LM, EM	–
detection at LM level of objects below the resolution of the LM, due to a bright isolated signal against a dark background	PCR, immunoassays	–
quality control of cell- and tissue culture	LM, phase-contrast microscopy	[42]
previewing of EM-ultra thin sectioning of tiny or thin objects	LM of counterstained semithin sections	–
comparison of sequential ultrathin sections for multiple labels	complicated done for small structures	[5]

* see Table 5

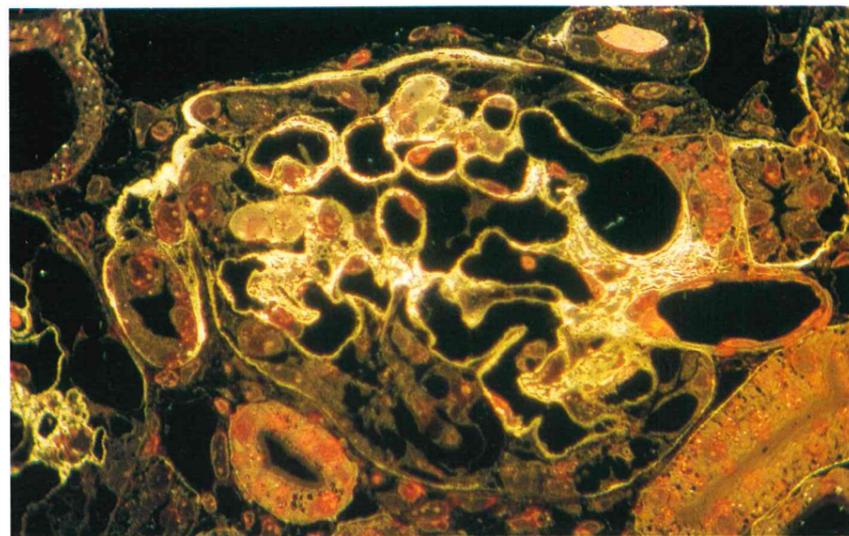


Abb. 8: Morphologische Veränderungen der extrazellulären Matrix während der Entwicklung einer Glomerulosklerose [41]. Schnitt einer Mausnieren mit Lupus-induzierter Glomerulosklerose, gefärbt mit einem anti-Laminin-Fragment-spezifischen monoklonalen Antikörper. Der in vivo-gebundene monoklonale Antikörper, mit Peroxidase konjugiert, wurde mit DAB detektiert, das Gewebe war in Epon eingebettet (Voreinbettung). Der gezeigte Ultradünnschnitt ist mit Toluidinblau leicht gegengefärbt.

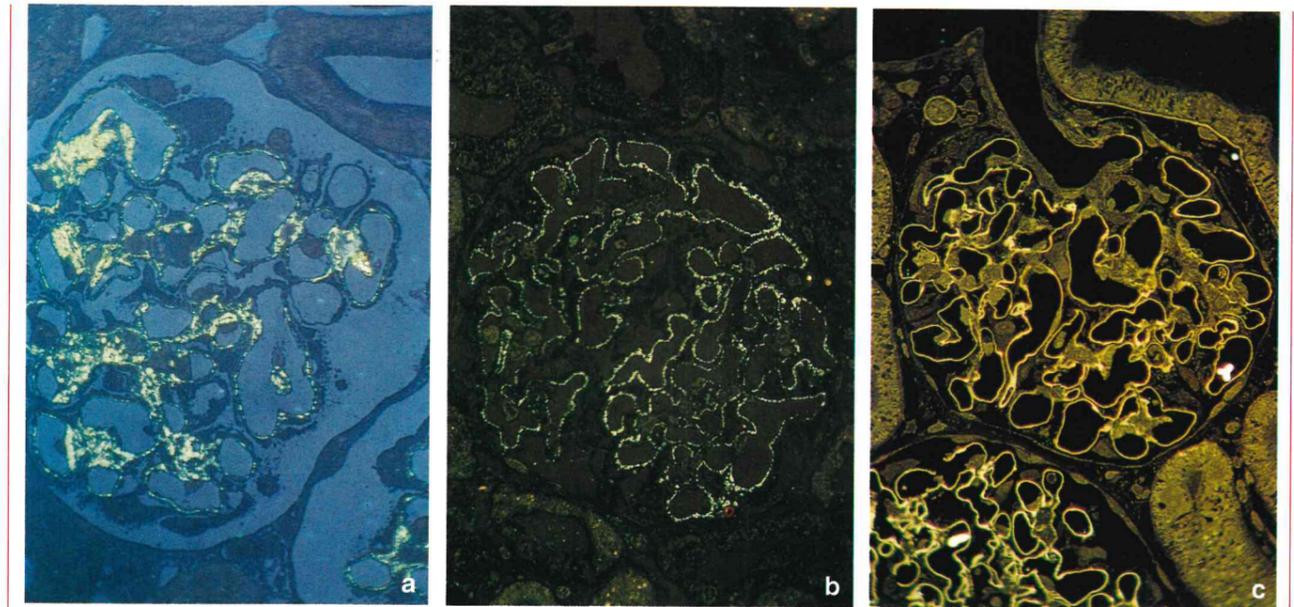


Abb. 9: Lokalisation von Immundeponits in der Nephrologie; 9a: IgG-Ablagerungen im Glomerulus einer Maus mit Graft Versus Host Disease-induzierter Lupus-Nephritis [9], dargestellt durch eine indirekte Immunogold-Markierung [14]. Ultradünner Lowicryl-Schnitt auf mit Gelatine beschichtetem Objektträger, gefärbt mit Kaninchen- α -Maus-IgG, anschließend mit 15 nm kolloidalem Gold-konjugiertem Ziegen- α -Kaninchen-IgG; 9b: Silber-verstärkte Immunogold-Färbung (IGSS) granulärer Immun-Deposits im Glomerulus einer Ratte, der Kaninchen-anti-gp330-Antikörper injiziert wurden [46]. Ultradünner Lowicryl-Schnitt auf mit Aminosilan beschicktem Objektträger, gefärbt mit Gold (5 nm), konjugiert an anti-Ratten-IgG, Silber-Verstärkung. 9c: Lineare Ablagerung von Kaninchen-anti-Laminin-Antikörpern in der Rattenniere, indirekte Färbung Immunoperoxidase-DAB. Epon-Ultradünnschnitt von voreingebettetem Gewebe.

Tabelle 4: Fachbereiche.

<p>Nephrologie Onkologie Biomaterial-Forschung Dermatologie Molekularbiologie Pharmakologie Pathologie Parasitologie Pflanzliche Molekularbiologie Chirurgie-Forschung Zellbiologie</p>

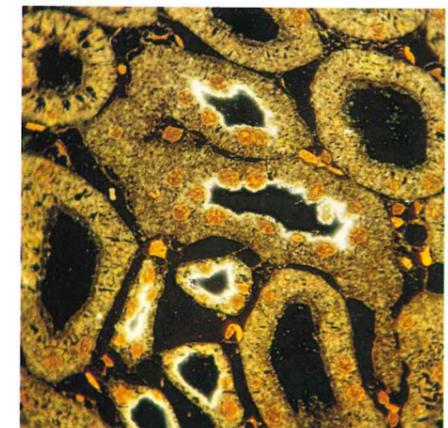


Abb. 10: Lectin-Cytochemie der experimentellen Ratten-Nephrolithiasis [8]. Lowicryl-Ultradünnschnitt der Rattenniere, gefärbt mit biotiniliertem Erdnuß-Agglutinin PNA) gefolgt von Streptavidin-PO DAB, gegengefärbt mit Hämatoxylin.

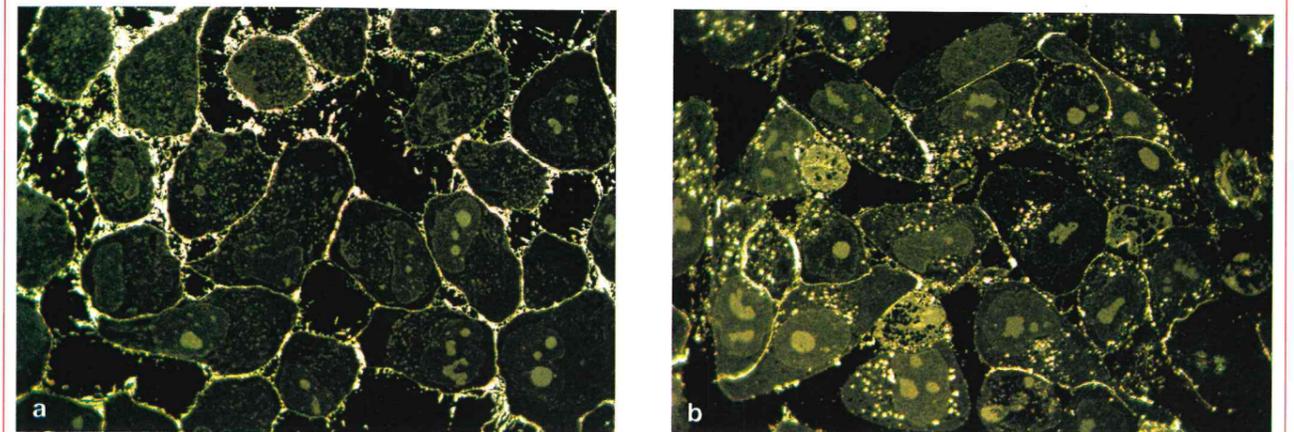


Abb. 11: Bindung (a) und Internalisation (b) von PO-markiertem cMOv18 auf und in HeLa-Zellen. Epon-Ultradünnschnitt einer voreingebetteten Zellkultur.

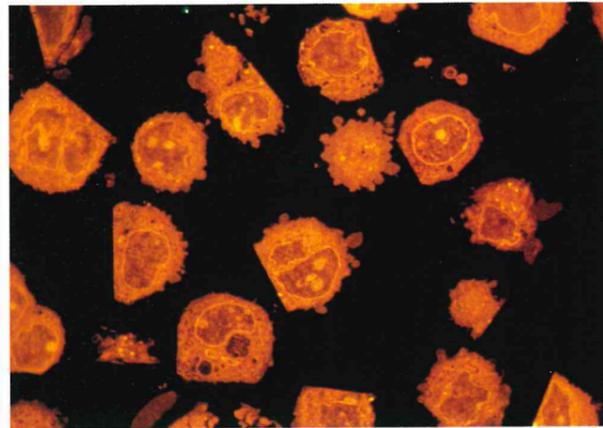


Abb. 12: Morphologische Charakterisierung einer menschlichen Brustkrebs-Zelllinie (MDA-MB-134-VI); man beachte die typischen Podosomen. Ultradünner Epon-Schnitt von fixierten Zellen, die vom Substrat abgekratzt, pelletisiert und in Epon eingebettet wurden, gegengefärbt mit Toluidinblau.

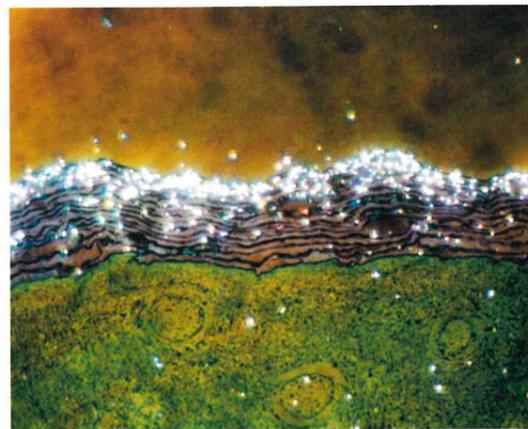


Abb. 14: Lichtmikroskopische Autoradiographie der menschlichen Haut; die mit Tritium markierte Oestradiol-Akkumulation im stratum corneum nach äußerlicher Applikation eines Oestradiol-Plaques [52, 53]. Ein 100 nm dicker Spurr-Schnitt, Emulsion Ilford L4, Entwicklung Kodak D19b.

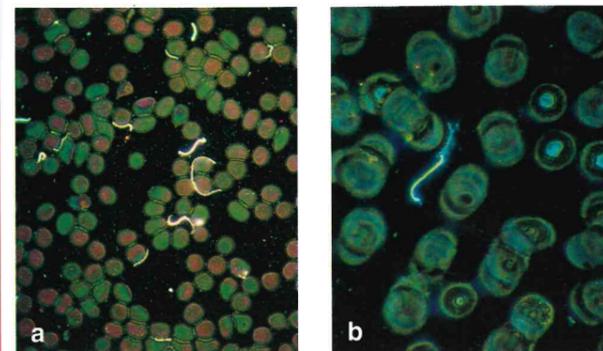


Abb. 15: Immunocytochemisch gefärbte Leptospiren im Blutausschlag. Das Blut war experimentell mit Leptospiren (Serumvariante grippotyphosa) infiziert. 15a: IGSS und 15b: PO-DAB. Man beachte die charakteristischen Spiralwindungen; das Bild wurde über ein Blaufilter aufgenommen.

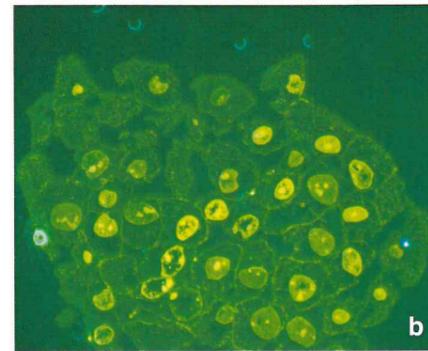
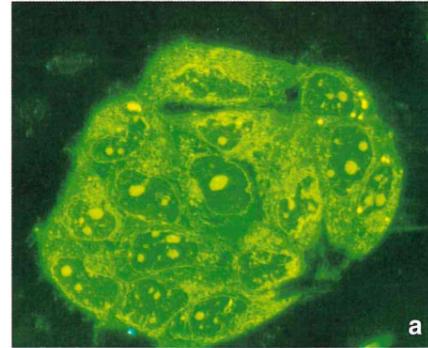


Abb. 13: Beobachtung einer Zellkultur von Dickdarmkarzinomzellen der Ratte (Zelllinie CC531) auf Art und Weise des Zelltodes nach Glutathion-Entzug. 13a: Kontroll-Zellen; 13b: Glutathion-gesperrte Zellen. Ultradünnschnitte der eingebetteten Monoschicht, geschnitten parallel zum Substrat, gegengefärbt mit Toluidinblau. Diese Bilder wurden aufgenommen mit einem RK-Mikroskop, ausgerüstet mit einer Hg-Lampe; der Vergleich mit Abb. 12 zeigt den Einfluß der Lichtquelle (alle anderen Bilder wurden mit einem RKM mit Xenon-Lampe aufgenommen).

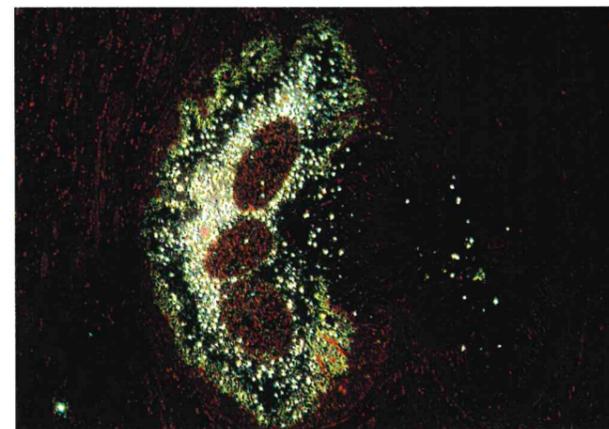
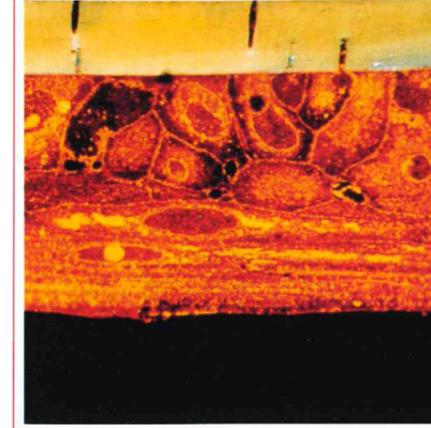


Abb. 16: Lokalisierung von Schistosoma mansoni-Antigenen durch indirekte Immungold-Färbung (10 nm Gold) von Eingeweide-assoziierten, zirkulierenden kathodischen Antigenen. Ultradünnschnitte mit Lichtgrün gegengefärbt. Beachte: die hellen weißen Flecken sind starke Reflexionen aufgrund des Hämatin-Zerfalls zurückzuführen, die bereits in ungefärbten Schnitten bemerkt wurden.

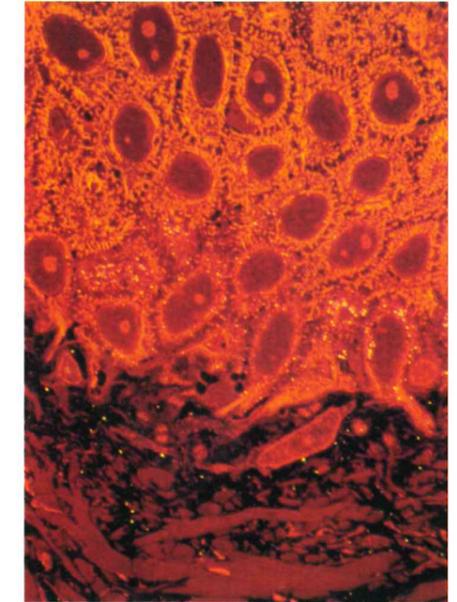
Lokalisations-Studien von Steroiden in der menschlichen Haut

Neelissen [52, 53] entwickelte eine einfache autoradiographische Methode für die Licht- und Elektronenmikroskopie zur Lokalisierung von ³H-Oestradiol in der menschlichen Haut, nach Permeations-Experimenten in vitro. Eine Bewertung der Leistungsfähigkeit der RKM-Darstellung in der hochauflösenden lichtmikroskopischen Autoradiographie (Abb. 14) ergab: Die Lokalisierung von ³H-Oestra-



17a

Abb. 17: Morphologische Qualitätskontrolle von gezüchteten menschlichen epidermalen Keratinozyten (17a). 17b: Ultradünner Epon-Schnitt von biotischer menschlicher Haut mit Epidermis- und Lederhautteil. Die Melanosomen sind aufgrund ihres starken Reflexionsvermögens sichtbar. Epon-Ultradünnschnitte mit Toluidinblau gefärbt.



17b

diol im menschlichen Stratum corneum war zur Unterscheidung zwischen inter- und intrazellulärer Lokalisation der Silberkörner im Stratum corneum mittels RKM fast genau so gut wie mit dem Elektronenmikroskop. Der Vorteil der RKM gegenüber der EM besteht in der Möglichkeit, das Präparat bei relativ geringer Vergrößerung zu überblicken und zugleich sogar wenige oder kleine Silberkörner zu sehen. Es wurde festgestellt, daß sich die RKM oft als sehr erfolgreich bei Untersuchungen der Lokalisation von Steroiden im menschlichen Stratum corneum erweist und nur fallweise die Elektronenmikroskopie zur Bestätigung der Resultate benötigt wird.

Vorkommen von Leptospiren in Diagnose-Proben

Die Feststellung selten auftretender Leptospiren in klinischen Proben kann man über die Kultur treffen. Jedoch versagt diese Methode manchmal, und sie ist zeitaufwendig. Der Nachweis von nur einigen wenigen Leptospiren anhand von Immunfluoreszenz bzw. der Peroxidase-Technik ist schwierig, da Artefakte, welche wie Leptospiren aussehen, im Lichtmikroskop Probleme bereiten. Mit RKM können mit Immunogold-Silber gefärbte Leptospiren in Urin- und Serumproben eindeutig sichtbar gemacht werden (Gravekamp und Prins, pers. Mitteilung). Die Unterscheidung zwischen Leptospiren und Artefakten ist hier leicht zu treffen, außerdem sind die charakteristischen Spiralen von IGSS- und PO-DAB-gefärbten Leptospiren in den RKM-Bildern zu sehen (Abb. 15). Der Vorteil der Reflexionskontrast- gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie besteht in der starken Zunahme des Bildkontrastes der gefärbten Leptospiren gegen einen dunklen Hintergrund und in der Vermeidung eines Ausbleichens des Markers, wodurch das Erkennen selten auftretender Leptospiren viel leichter ist.

Experimentelle Studien zur Glomerulosklerose

An Versuchsmodellen der Glomerulosklerose ermöglichte die RKM-Technik es Bergijk et al. [5], die extrazelluläre Matrix (ECM-)Komponente Fibronectin als Hauptbestandteil der sklerotischen Läsion zu identifizieren. Die Feststellung dieser Läsionen durch Färbung mit Perjodsäure nach Schiff (PAS) sagen in der allgemeinen Nierenerkrankung eine progressive Nierenerkrankung voraus. Dies konnte durch Färbung von ultradünnen Serienschnitten desselben Glomerulus mit PAS und verschiedenen anti-ECM-Antikörpern gezeigt werden. Diese reflexionsmikroskopischen Befunde konnten durch Immuno-EM-Untersuchungen bestätigt werden.

Pflanzliche Molekularbiologie

Zur Demonstration der Beteiligung von Lektinen bei der Knotenbildung, brachten Diaz et al. [23] das Lektin-Gen der Erbse (*Pisum sativum L.*) in die Haarwurzeln des Weißklee (*Trifolium repens L.*) ein und zeigten damit, daß diese transgenen Wurzeln durch die Rhizobium-Variante, die normalerweise Erbsenwurzeln aber nicht Weißklee-wurzeln noduliert, zu Knotenbildung angeregt werden.

Diaz et al. [22] konnten Erbsen-Lectin an den Spitzen wachsender Wurzelhaare von Erbsen lokalisieren, indem sie als Ligand Ratten-IgE, ein biotinylierter Antikörper gegen Ratten IgE und an FITC-gekoppeltes Streptavidin, benutzten. Bei ihnen versagte diese Methode, wenn man sie bei transgenen Weißklee-Wurzeln anwandte. Jedoch durch Anwendung von RKM bei Präparaten, welche mit einem Goldpartikel gekoppelt und silberverstärktem Streptavidin gefärbt waren, konnten sie zeigen, daß Erbsen-Lectin in transgenen Weißklee-Wurzeln funktionell exprimiert wird.

Nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung

Macville et al. [49, 50] benutzen RKM und TEM zur Kontrolle von Morphologie und Signal während der Entwicklung von Verfahren zur elektronenmikroskopischen Voreinbettung nicht-radioaktiver RNA *in situ*-Hybridisierung (ISH). Die erhaltenen RKM-Bilder lieferten Hinweise zur Morphologie, die man im TEM sehen kann.

Erkennung von Biomaterialien durch deren Unterschiede im Brechungsindex

Reflexionskontrast-Mikroskopie wurde zur Untersuchung von Biomaterial, wie Haut-Ersatz in der Haut und Festigungsmaterial zwischen Knochen und Implantat eingesetzt. Das Abbauverhalten von Calciumphosphat-Keramik wurde an einem Mäuse-Modellsystem studiert. Ein Problem, auf das man bei der Bearbeitung für die Elektronenmikroskopie trifft, ist der Verlust von Biomaterial während des Färbeprozesses. Da für RKM aber Ultradünnschnitte direkt auf Glasobjektträger aufgebracht werden und die Biomaterialien unterschiedliche Brechungsindizes besitzen, ergibt dies oft im RKM starke Reflexionssignale und eine optimale Abbildung (Abb. 18 und 19).



Abb. 18: Histologisches Erscheinungsbild von Copolymer-Matrizen, seit 52 Wochen subkutan in Ratten implantiert; Epon-Ultradünnschnitt.

Transplantations-Forschung

Der Vorgang zur Isolierung von Langerhans'schen Inseln aus dem Pankreas zum Zwecke einer Transplantation in Diabetes-Patienten wurde verbessert. Van den Burg et al. [10] benutzen die Reflexionskontrast-Mikroskopie zur Kontrolle der Unversehrtheit der Insel und Erhaltung des Insulin-Inhalts im Zuge der Verbesserung einer Insel-Isolierungstechnik. RKM wurde eingesetzt, um verschiedene Stadien vom nativen Hunde-Pankreas mit den gereinigten isolierten Langerhans'schen Inseln im Hinblick auf den Grad der Betazellen-Granulation, die nach der Immunogoldfärbung für Insulin sichtbar ist, zu vergleichen (Abb. 20).

Das Zunehmen der Forschung auf molekularbiologischer Ebene hat zu mehr Immunlokalisations-Studien von Gen-Produkten geführt [22, 38] und wird weiter dazu führen. Wichtige Fragen sind: wird das (transferierte) Gen exprimiert und wo wird das (transferierte) Gen-Produkt lokalisiert. Ultra-Kryomikrotomie in Verbindung mit RKM ist für diese Untersuchungen zur optimalen Lokalisation vorgeschlagen worden (Prins, pers. Mitteilung). Der Informationsinhalt der RKM-Bilder ultradünner Kryoschnitte ist vergleichbar mit der von ultradünnen Plastikschnitten und erwies sich neben der Zugänglichkeit für immunologische Reagenzien als optimal. Das Ultradünnschneiden mit Hilfe eines ultra-Kryomikrotoms (Reichert ULTRACUT F/FC S) ist heute ein Routinevorgang. Wenn jedoch die Antigenwirkung durch die Fixation vermindert wird, kann die Kryosubstitutionsmethode nach Edelmann [25] weiterhelfen, nämlich Gefriertrocknen und Infiltrieren der Schnitte mit Lowcryl in einem Kryosorptions-Gefriertrockner. Neben der Herstellung von Ultradünnschnitten dieser in Lowicryl-eingebetteten Präparate, können auch Semidünnschnitte (0,25 µm) angefertigt werden, falls nurmehr ein Routine-Mikrotom verfügbar ist. Die Markierungseffektivität von Lowicryl-Schnitten kann geringer sein im

Tabelle 5: Reflexionskontrast in der Immunocytochemie.

- Scharfe Abbildungen von semidünnen (0,25 µm) und ultradünnen (50–100 nm) RKM-Präparaten wegen Wegfall prä- und post-fokaler Teilbilder.
- Empfindliche Detektionsmöglichkeit vieler Marker: Immunogold, Immunogold-Silber, Immunoperoxidase und alkalische Phosphatase.
- Zusätzlich zu den Immunomarkern, können histologische Färbungen vorgenommen werden, um die morphologische Identifizierung von Zell- und Gewebestrukturen zu unterstützen.
- Detektion von Vielfach-Immunomarkern bei *in situ*-Hybridisierung.
- Stabilität des Markers: es gibt kein Fading-Problem wie in der Fluoreszenzmikroskopie.
- Hoher Kontrast zwischen Marker und Gegenfärbung.
- Leichte Kombinationsmöglichkeit mit Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie.
- Alternative zur Elektronenmikroskopie mit geringer Vergrößerung, wenn ein hoher Kontrast des cytochemischen Markers gefordert ist.
- Brücke zwischen Licht- und Elektronenmikroskopie bei Verwendung ultradünner Schnitte.

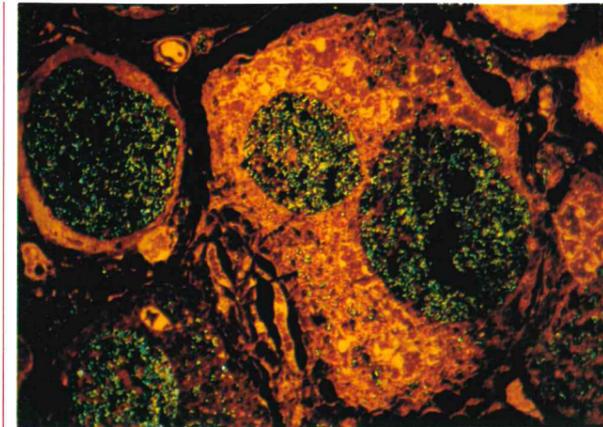


Abb. 19: Degradation von implantiertem Biomaterial. Phagozytiert und zerfallene Kugeln von injiziertem Hydroxylapatit in einer Riesenzelle. Ultradünnschnitte mit Toluidinblau gegengefärbt.

Vergleich mit der von Kryoschnitten, da bei jenen nur die Oberfläche für Antikörper zugänglich ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich die Reflexionskontrast-Mikroskopie als eine vielseitige Darstellungsmethode mit stark kontrastverstärkenden Eigenschaften erwiesen hat. Die Detektionsempfindlichkeit ist im Vergleich zu anderen lichtmikroskopischen Methoden signifikant gesteigert. Wenn Ultradünnschnitte verwendet werden, zeigen die Bilder die beste morphologische Genauigkeit, die mit der Lichtmikroskopie erreichbar ist.

Danksagung

Die Autoren sprechen für die Überlassung von Gewebepreparaten und Photographien folgenden Personen ihren Dank aus:

Dr. E. C. Bergijk, Department of Pathology, University of Leiden; Dr. J. A. Bruijn, Department of Pathology, University of Leiden; Dr. M. P. M. van der Burg, Department of Surgery, Leiden University Hospital; Dr. J. H. van Dierendonck, Department of Surgery, Leiden University Hospital; Dr. C. L. Diaz, Department of Molecular Plant Sciences, University of Leiden; Ing. A. G. M. van Dorp, Department of Dermatology and Biomaterial, Academic Hospital Leiden; Prof. Dr. A. M. Deelder, Department of Parasitology, University of Leiden; Dr. C. Gravekamp, Brigham and Women Hospital, Boston, USA; Dr. H. K. Koerten, Department of Electron microscopy, University of Leiden; Dr. C. J. Kootstra, Department of Pathology, University of Leiden; Dr. J. A. M. Neelissen, Astra Pain Control AB, Södertälje, Sweden; Dr. E. J. M. Speel, Department of Molecular Cell Biology and Genetics, University of Maastricht; Prof. Dr. S. O. Warnaar, Department of Pathology, University of Leiden.

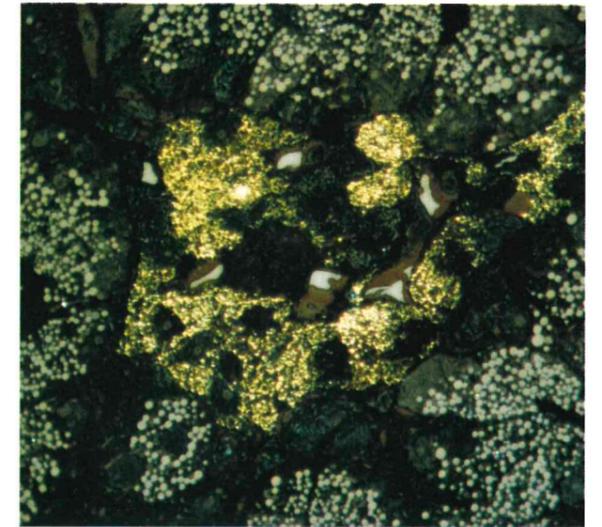


Abb. 20: Langerhans'sche Inseln im nativen Hunde-Pankreas, Insulinfärbung mit Immunogold (15 nm); der Grad der Betazellen-Granulation ist sichtbar.

Literatur

[1] Abercrombie, M., G. A. Dunn: Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. – *Exp. Cell Res.*, **92**, 57–62, 1975.

[2] Beck, K., J. Bereiter-Hahn: Evaluation of reflection interference contrast microscope images of living cells. – *Microsc. Acta*, **84**, 153–178, 1981.

[3] Bereiter-Hahn, J., C. H. Fox, B. Thorell: Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. – *J. Cell. Biol.*, **82**, 767–779, 1979.

[4] Bergijk, E. C., J. J. Baelde, E. de Heer, P. D. Killen, J. A. Bruijn: The role of the extracellular matrix in development of glomerulosclerosis in experimental chronic serum sickness. – *Exp. Nephrol.*, **3**, 338–347, 1995.

[5] Bergijk, E. C., C. Munaut, J. J. Baelde, F. A. Prins, J. M. Foidart, P. J. Hoedemaeker, J. A. Bruijn: A histologic study of the extracellular matrix during the development of glomerulosclerosis in murine chronic graft-versus host disease. – *Am. J. Pathol.*, **140**, 1147–1156, 1992.

[6] Bianco, P., A. Boyde: Alkaline phosphatase cytochemistry in confocal scanning light microscopy for imaging the bone marrow stroma. – *Bas. Appl. Histochem.*, **33**, 17–23, 1989.

[7] Boyde, A., M. Petran, M. Hadravsky: Tandem scanning reflected light microscopy of internal features in whole bone and tooth samples. – *J. Microsc.*, **132**, 1–7, 1983.

[8] Bruijn de, W. C., R. de Water, E. R. Boev, P. R. W. A. van Run, P. J. Vermaire, P. P. M. C. van Miert, J. C. Romijn, C. F. Verkoelen, L. C. Cao, F. H. Schröder: Lectin-cytochemistry of experimental rat nephrolithiasis. – *Scanning Microscopy*, **10**, 557–576, 1996.

[9] Bruijn, J. A., E. H. van Elven, P. C. W. Hogendoorn, W. E. Corver, P. J. Hoedemaeker, J. J. Fleuren: Animal model of human disease. Murine chronic graft-versus-host disease as a model for lupus nephritis. – *Am. J. Pathol.*, **130**, 639–641, 1988.

[10] Burg van der, M. P. M., O. R. Guicherit, M. Frölich, J. P. Scherft, F. A. Prins, J. A. Bruijn, H. G. Gooszen: Assessment of islet isolation efficacy in dogs. – *Cell. Transplant.*, **3**, 91–101, 1994.

[11] Cornelese-ten Velde, I.: Reflection Contrast Microscopy as a tool in cytochemistry. – Thesis University of Leiden, The Netherlands, ISBN 90-9003710-1, 1990.

- [12] **Cornelese-ten Velde I., J. Bonnet, H. J. Tanke, J. S. Ploem:** Reflection contrast microscopy. Visualization of (peroxidase-generated) diaminobenzidine polymer products and its underlying optical phenomena. – *Histochemistry*, **89**, 141–150, 1988.
- [13] **Cornelese-ten Velde I., J. Bonnet, H. J. Tanke, J. S. Ploem:** Reflection contrast microscopy performed on epi-illumination microscope stands: comparison of reflection contrast- and epi- polarization microscopy. – *J. Microsc.*, **159**, 1–13, 1990.
- [14] **Cornelese-ten Velde, I., F. A. Prins:** New sensitive light microscopical detection of colloidal gold on ultrathin sections by RCM. Combination of reflection contrast and electron microscopy in post-embedding immunogold histochemistry. – *Histochemistry*, **94**, 61–71, 1990.
- [15] **Cornelese-ten Velde, I., J. Wiegant, H. J. Tanke, J. S. Ploem:** Improved detection and quantitation of the (immuno) peroxidase product using reflection contrast microscopy. – *Histochemistry*, **92**, 153–160, 1989.
- [16] **Cottler-Fox, M., W. Ryd, B. Hagmar, C. H. Fox:** Adhesion of metastatic and non-metastatic carcinoma cells to glass surfaces. – *Int. J. Cancer*, **26**, 689–694, 1980.
- [17] **Couchman, J. R., D. A. Rees:** The behaviour of fibroblasts migrating from chick heart explants: changes in adhesion, locomotion and growth, and in the distribution of actomyosin and fibronectin. – *J. Cell. Sci.*, **39**, 149–165, 1979.
- [18] **Couchman, J. R., J. Yates, R. J. B. King, R. A. Badley:** Changes in microfilament and focal adhesion distribution with loss of androgen responsiveness in cultured mammary tumor cells. – *Cancer Research*, **41**, 263–269, 1981.
- [19] **Creemers, A. F., N. Jansen in de Wal, J. Wiegant, R. W. Dirks, P. Weisbeek, M. van der Ploeg, J. E. Landegent:** Non-radioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy. – *Histochemistry*, **86**, 609–615, 1987.
- [20] **Curtis, A. S. G.:** The mechanism of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy. – *J. Cell. Biol.*, **20**, 199–215, 1964.
- [21] **De Jong D., F. Prins, H. H. J. M. van Krieken, D. Y. Mason, G. B. van Ommen, P. M. Kluin:** Subcellular localization of bcl-2 protein. – *Microbiology and immunology*, **182**, 287–292, 1992.
- [22] **Diaz, C. L., T. J. J. Logman, H. C. Stam, J. W. Kijne:** Sugar-binding active of pea lectin expressed in white clover hairy roots. – *Plant. Physiol.*, **109**, 1167–1177, 1995.
- [23] **Diaz, C. L., P. J. J. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg, J. W. Kijne:** Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. – *Nature*, **338**, 579–581, 1989.
- [24] **Dunn, G. A.:** Mechanisms of fibroblast locomotion. Cell adhesion and motility (ed. by A.S.G. Curtis and J.D. Pitts). – Cambridge University Press, 409–423, 1979.
- [25] **Edelmann, L.:** Low temperature embedding of chemically unfixed biological material after cryosorption freeze-drying. – *Scanning Microscopy*, **8**, 551–562, 1994.
- [26] **Fauré-Frémiet, E.:** Caracteres physico-chimiques des choanoleucocytes de quelques Invertébrés. – *Protosplasma*, **VI**, 525–608, 1930.
- [27] **Filler, T. J., C. H. Rickert, U. K. Fassnacht, F. Pera:** Reflection contrast microscopy within chrome-alum haematoxylin stained thick tissue-sections. – *Histochemistry*, **101**, 375–378, 1994.
- [28] **Geiger, B., Z. Avnur, G. Rinnerthaler, H. Hinssen, V. J. Small:** Microfilament-organizing centers in areas of cell contact: cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion. – *J. Cell. Biol.*, **99**, 83s–91s, 1984.
- [29] **Gingell, D.:** The interpretation of interference-reflection images of spread cells: significant contributions from thin peripheral cytoplasm. – *J. Cell. Sci.*, **49**, 237–247, 1981.
- [30] **Gingell, D., I. Todd:** A quantitative theory for image interpretation and its application to cell-substratum separation measurement. – *Biophys. J.*, **26**, 507–526, 1979.
- [31] **Gingell, D., S. Vince:** Substratum wettability and charge influence the spreading of Dictyostellum amoeba and the formation of ultrathin cytoplasmic lamellae. – *J. Cell. Sci.*, **54**, 255–285, 1982.

- [32] **Haemmerli, G., P. Strauli, J. S. Ploem:** Cell-to-substrate adhesions during spreading and locomotion of carcinoma cells. A study by microcinematography and reflection contrast microscopy. – *Exp. Cell. Res.*, **128**, 249–256, 1980.
- [33] **Heath, J. P., G. A. Dunn:** Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. – *J. Cell. Sci.*, **29**, 197–212, 1978.
- [34] **Hoefsmit, E. C. M., C. Korn, N. Blijleven, J. S. Ploem:** Light microscopical detection of single 5 and 20 nm gold particles used for immunolabelling of plasma membrane antigens with silver enhancement and reflection contrast. – *J. Microsc.*, **143**, 161–169, 1986.
- [35] **Hopman, H. A. H. N., J. Wiegant, G. I. Tesser, P. Duijn:** A nonradioactive in situ hybridization method based on mercurated nucleic acid probes and sulfhydrylhapten ligands. – *Nucl. Acid Res.*, **14**, 6471–6488, 1986.
- [36] **Izzard, C. S., L. R. Lochner:** Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. – *J. Cell. Sci.*, **21**, 129–159, 1976.
- [37] **Izzard, C. S., L. R. Lochner:** Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study. – *J. Cell. Sci.*, **42**, 81–116, 1980.
- [38] **De Jong, D., F. A. Prins, D. Y. Mason, J. C. Reed, G. B. van Ommen, P. M. Kluin:** Subcellular Localization of bcl-2 Protein in Malignant and Normal Lymphoid Cells. – *Cancer Research*, **54**, 256–260, 1994.
- [39] **Keller, H. U., S. Barandun, S. Kistler, J. S. Ploem:** Locomotion and adhesion of neutrophil granulocytes. Effects of albumin, fibrinogen and gamma globulins studied by reflection contrast microscopy. – *Exp. Cell. Res.*, **122**, 351–362, 1979.
- [40] **Koerten, H. K., J. S. Ploem, W. T. Daems:** Ingestion of latex beads by filopodia of adherent mouse peritoneal macrophages. A scanning electron microscopical and reflection contrast microscopical study. – *Exp. Cell. Res.*, **128**, 470–475, 1980.
- [41] **Kootstra, C. J., E. C. Bergijk, A. Veninga, F. A. Prins, E. de Heer, D. R. Abrahamson, J. A. Bruijn:** Qualitative Alterations in Laminin Expression in Experimental Lupus Nephritis. – *Am. J. Pathol.*, **147**, 476–488, 1995.
- [42] **Kruidering, M., D. H. Maasdam, F. Prins, E. de Heer, G. J. Mulder, J. F. Nagelkerke:** Evaluation of nephrotoxicity in vitro using a suspension of highly purified porcine proximal tubular cells and characterization of the cells in primary culture. – *Exp. Nephrol.*, **2**, 334–344, 1994.
- [43] **Kumar Mittal, A., J. Bereiter-Hahn:** Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells: I. Role of calcium influx. – *Cell. Motility*, **5**, 123–136, 1985.
- [44] **Landegent, J. E., N. Jansen in de Wal, G. B. van Ommen, F., Baas, J. J. M. de Vijlder, P. van Duijn, M. van der Ploeg:** Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization. – *Nature*, **317**, 175–177, 1984.
- [45] **Landegent, J. E., N. Jansen in de Wal, J. S. Ploem, M. van der Ploeg:** Sensitive detection of hybridocytochemical results by means of reflection-contrast microscopy. – *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 1241–1246, 1985.
- [46] **Van Leer, E. H. G., P. Ronco, P. Verroust, A. M. van der Wal, P. J. Hoedemaeker, E. De Heer:** Epitope specificity of anti-gp330 autoantibodies determines the development of proteinuria in active Heymann nephritis. – *Am. J. Pathol.*, **142**, 821–829, 1993.
- [47] **Lejeune, J.:** Reflexion analysis. A new method of observing chromosomes. – *Ann. Genet.*, **28**, 67–68, 1985.
- [48] **Lochner, L., C. S. Izzard:** Dynamic aspects of cell-substrate contact in fibroblast motility. – *J. Cell. Biol.*, **59**, 199a, 1973.
- [49] **Macville, M. V. E., A. M. van Dorp, K. C. Wiesmeijer, R. W. Dirks, J. A. M. Fransen, A. Raap:** Monitoring morphology and signal during non-radioactive in situ hybridization procedures by reflection-contrast microscopy and transmission electron microscopy. – *J. Histochem. Cytochem.*, **43**, 665–674, 1995.
- [50] **Macville, M. V. E., K. C. Wiesmeijer, R. W. Dirks, J. A. M. Fransen, A. Raap:** Saponin pretreatment in pre-embedding electron microscopic in situ hybridization for the detection of specific RNA sequences in cultured cells: a methodological study. – *J. Histochem. Cytochem.*, **43**, 1005–1018, 1995.
- [51] **Multhaupt, H., G. Gross, P. Fritz, K. Köhler:** Cellular localisation of induced human interferon- β mRNA by non-radioactive in situ hybridization. – *Histochemistry*, **91**, 315–319, 1989.

- [52] **Neelissen, J. A. M.:** Visualization of percutaneous steroid transport, Thesis University of Leiden. – The Netherlands, ISBN 90-74538-11-8, 1996.
- [53] **Neelissen, J. A. M.:** Optimization and validation of freeze-drying for light and electron microscopic autoradiography of percutaneous steroid transport. – *J. Control. Rel.*, **42**, 1–13, 1996.
- [54] **Opas, M., V. I. Kalnins:** Surface reflection interference microscopy: a new method for visualizing cytoskeletal components by light microscopy. – *J. Microsc.*, **133**, 291–306, 1984.
- [55] **Paddock, S.W.:** Incident light microscopy of normal and transformed cultured fibroblasts stained with Coomassie blue R250. – *J. Microsc.*, **128**, 203–205, 1982.
- [56] **Patzelt W. J.:** Reflexionskontrast, eine neue lichtmikroskopische Technik. – *Mikrokosmos*, **3**, 78–81, 1977.
- [57] **Patzelt, W. J.:** Reflection Contrast, a new optical microscope method. – *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn.*, **7**, 141–143, 1977.
- [58] **Pera, F.:** Uses of the LEITZ reflection contrast device in histology and cytology. – *Sci. Techn. Inf.*, **7**, 147–151, 1979.
- [59] **Pera, F.:** Effects of reflection-contrast microscopy in stained histological, hematological and chromosome preparations. – *Mikroskopie*, **35**, 93–100, 1979.
- [60] **Petran, M., M. Hadravsky, M. D. Egger, R. Galambos:** Tandem-scanning reflected light microscope. – *J. Opt. Soc. Am.*, **58**, 661–664, 1968.
- [61] **Piller, H.:** Enhancement of contrast in reflected-light microscopy. – *Zeiss-Werkschrift*, **34**, 87–90, 1959.
- [62] **Ploem J. S.:** General introduction. – *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **254**, 40, 1975.
- [63] **Ploem, J. S.:** Reflection-contrast microscopy as a tool for investigation of the attachment of living cells to a glass surface. – In: R. van Furth. (Ed.) Mononuclear phagocytes in immunity, 405–421, Blackwell, Oxford, 1975.
- [64] **Pluta, M.:** Advanced Light Microscopy. Specialized Methods. 197–210, Elsevier PWN-Polish Scientific Publishers, Warszawa, 1989.
- [65] **Prins, F. A., J. A. Bruijn, E. De Heer:** Applications in renal immunopathology of reflection contrast microscopy, a novel superior light microscopical technique. – *Kidney Int.*, **49**, 261–266, 1996.
- [66] **Prins, F. A., R. van Diemen-Steenvoorde, J. Bonnet, I. Cornelese ten Velde:** Reflection contrast microscopy of ultrathin sections in immunocytochemical localization studies: a versatile technique bridging electron microscopy with light microscopy. – *Histochemistry*, **99**, 417–425, 1993.
- [67] **Raz, A., B. Geiger:** Altered organization of cell-substrate contacts and membrane associated cytoskeleton in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities. – *Cancer Research*, **42**, 5183–5190, 1982.
- [68] **Retief, A. E.:** Fluorescence of Giemsa and related stains: the CF banding of chromosomes. – *Cytogenet. Cell. Genet.*, **21**, 296–299, 1978.
- [69] **Robinson, J. M., B. E. Batten:** Detection of diaminobenzidine reactions using scanning laser confocal reflectance microscopy. – *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 1761–1765, 1989.
- [70] **Speel, E. J. M., M. Kramps, J. Bonnet, F. C. S. Ramaekers, H. A. H. N. Hopman:** Multicolour preparations for in situ hybridization using precipitating enzyme cytochemistry in combination with reflection contrast microscopy. – *Histochemistry*, **100**, 357–366, 1993.
- [71] **Stach, E.:** Vervollkommungen der Kohlen-Auflichtmikroskopie. – *Glückauf*, **85**, 117–122, 1949.
- [72] **Strohmeier, R., J. Bereiter-Hahn:** Control of cell shape and locomotion by external calcium. – *Exp. Cell. Res.*, **154**, 412–420, 1984.
- [73] **Todd, I., J. S. Mellor, D. Gingell:** Mapping cell-glass contacts of Dictyostellium amoebae by total internal reflection aqueous fluorescence overcomes a basic ambiguity of interference reflection microscopy. – *J. Cell. Sci.*, **89**, 107–114, 1988.
- [74] **Tokuyasu, K. T.:** Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. – *J. Microsc.*, **143**, 139–149, 1986.
- [75] **Van der Ploeg, M., J. Bonnet, P. van Duijn:** Pseudofluorescence of Giemsa-stained chromosomes. – *Cytogenet. Cell. Genet.*, **23**, 279–280, 1979.
- [76] **Van der Ploeg, M., P. van Duijn:** Reflection versus fluorescence: a note on the physical backgrounds of two types of light microscopy. – *Histochemistry*, **62**, 227–232, 1979.

- [77] **Verscheuren, H.:** Interference reflection microscopy in cell biology: Methodology and applications. – *J. Cell. Sci.*, **75**, 279–301, 1985.
- [78] **Westphal, A.:** Einführung in die Reflexmikroskopie und die physikalischen Grundlagen mikroskopischer Bildentstehung, George Thieme, Stuttgart, 1963.

Korrespondenz-Anschrift der Verfasser:
Dr. F. A. Prins, Department of Pathology, Leiden University,
P.O.-Box 9600, 2300 RC Leiden, The Netherlands.