

Methode:

Polarisationsmikroskopie in der Biologie

Literatur:

MIKROKOSMOS 66, 233-239 u. 263-268 (1977)

Anwendungsbereich: Mikroskope mit intensiver Beleuchtung.

Botanik, Histologie, Zoologie. Schnitte und Totalpräparate

1. Einführung und qualitative Beobachtungen**Geschichtlicher Überblick**

E. L. Malus, der Entdecker der Polariation des Lichtes, hat bereits im Jahre 1811 biologische Objekte mit seinem „Polarisationsapparat“ beobachtet. Noch im gleichen Jahrzehnt begann D. Brewster mit der planvollen Untersuchung von Gebilden organischer Herkunft. Als H. F. Talbot 1834 das Mikroskop mit zwei von W. Nicol 1833 erfundenen Polarisationsprismen aus Kalkspat ausgerüstet und damit ein brauchbares Polarisationsmikroskop geschaffen hatte, konnten auch mikroskopisch kleine Strukturelemente im polarisierten Licht untersucht werden.

Es ist wenig bekannt, daß eigentlich B. G. Amici (um 1830) das erste Polarisationsmikroskop benutzt hat, doch wurde dieses Instrument erst 1844 vollständig beschrieben. Sein Polarisator bestand aus einem Glasplattensatz, der Analysator aus einem Kalkspatkristall oberhalb des Okulars. Von den beiden Teilbildern, die infolge Doppelbrechung des Kristalls entstanden, konnte das eine oder andere durch eine drehbare Lochblende ausgeschaltet werden.

Das Polarisationsbild der quergestreiften Muskelfaser, der Markscheide der Nervenfasern, der Grundmasse des Knochengewebes und viele andere polarisationsoptische Erscheinungen waren bereits in der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts be-

kannt. Auch über die möglichen Ursachen der Doppelbrechung wurde damals lebhaft diskutiert. Die verwickelte Sachlage wurde jedoch erst in den Jahren 1910 bis 1919 durch die Untersuchungen H. Ambronn's geklärt. Er gelangte zu einer Trennung von photoelastischem Effekt und Orientierungsdoppelbrechung und konnte sogar bei letzterer zwei ganz verschiedene Anteile unterscheiden: Die Texturdoppelbrechung (Formdoppelbrechung) und die Eigendoppelbrechung. Aufgrund dieser Erkenntnisse ließ sich die Polarisationsoptik von Zell- und Gewebestrukturen befriedigend deuten und für die Analyse des Feinbaus verwenden.

Während sich das Polarisationsmikroskop in der Mineralogie und Petrographie rasch zum bedeutendsten Meßinstrument entwickelt hat, ist es im wesentlichen das Verdienst von W. J. Schmidt (1929—1959), daß die moderne polarisationsoptische Methodik auch in die biologische Forschung eingeführt wurde. Die Histophysik ist ein Arbeitsgebiet, das mit Hilfe physikalischer Methoden zur Erforschung der molekularen Struktur und stofflichen Zusammensetzung des Gewebes beiträgt. Dabei spielt das Polarisationsmikroskop eine wichtige Rolle. Die polarisationsoptischen Methoden der Histophysik haben G. Scheuner und J. Huttschenreiter 1972 ausführlich beschrieben.

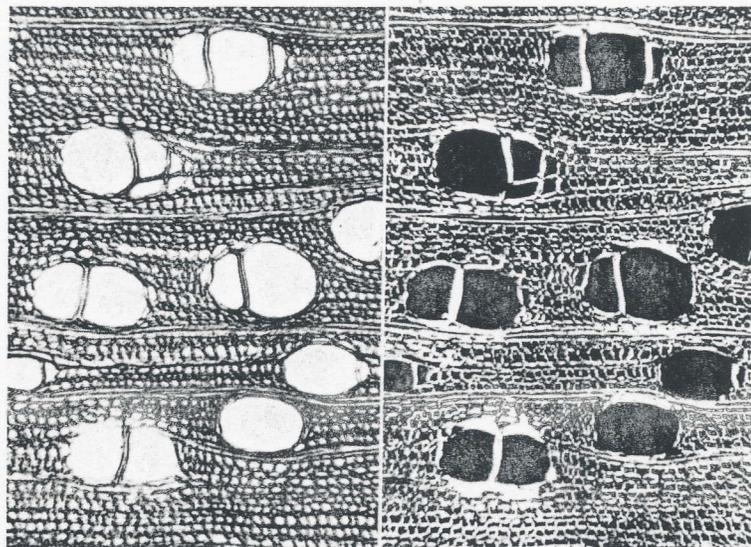


Bild 1: Afrikanisches Teakholz (quer) im gewöhnlichen und polarisierten Licht. Achromat $10\times/0,24$: Projektiv $8\times$.

Mit diesem Beitrag sollen nur einige Anwendungsmöglichkeiten des Polarisationsmikroskops gezeigt werden.

Polarisiertes Licht

Die Polarisation des Lichtes wird in allen einschlägigen Lehrbüchern ausführlich beschrieben. Man kann die elektromagnetische Wellenbewegung des Lichtes mit den Gesetzen der Wellenbewegung besser vergleichen, wenn man sich einen hypothetischen „Lichtäther“ vorstellt, dessen „Teilchen“ von der Wellenbewegung erfaßt werden.

Unter polarisiertem Licht versteht man allgemein nur sichtbare Strahlung, die in einer einzigen Richtung schwingt. Im gewöhnlichen Licht sind hingegen die verschiedensten Schwingungsrichtungen des Lichtvektors mit gleicher Größe vorhanden. Zwischen den einzelnen Wellenzügen bestehen die verschiedensten Phasenverhältnisse. Bei polarisiertem Licht schwingt der Lichtvektor *regelmäßig* in bestimmten, ausgezeichneten Richtungen. Neuerdings findet auch polarisiertes ultraviolettes und infrarotes Licht in der Mikroskopie Anwendung. Da jedoch hierfür besondere Polarisatoren erforderlich sind, werden diese Verfahren hier nicht behandelt.

Man unterscheidet zwei Arten von polarisiertem Licht:

1. das *linear* polarisierte Licht. Sein Lichtvektor schwingt in einer Ebene, die sich zeitlich und räumlich nicht verändert.
2. das *elliptisch* polarisierte Licht. Sein Lichtvektor schwingt in einer zur Ausbreitungsrichtung der Lichtwelle senkrechten Ebene, die sich mit gleicher Winkelgeschwindigkeit dreht. Der Endpunkt des Lichtvektors beschreibt eine Ellipse. Als Spezialfall des elliptisch polarisierten Lichtes gilt das *zirkular* polarisierte Licht. Hier beschreibt der Endpunkt des Lichtvektors einen Kreis.

Polarisationsfilter

Für die Erzeugung polarisierten Lichtes benutzte man früher zusammengesetzte Teilprismen aus optisch einachsigen Kristallen (z. B. Nicolsche Prismen aus Kalkspat). Da solche Kristalle sehr kostspielig sind und keine Ausnutzung der Kondensorapertur ermöglichen, verwendet man heute fast ausschließlich Polarisationsfilter. Es handelt sich dabei um hochpolymere Kunststoff-

Folien, die durch mechanisches Strecken molekular gleichgerichtet und neutralgrau eingefärbt sind. Die polarisationsoptisch wirksame Schicht ist, wenn sie als ungefaßte Folie verwendet wird, beidseitig mit Zelloseacetobutyrat überzogen. Die Folien lassen sich schneiden und stanzen. Sie sind mechanisch stabil, thermisch bis 80° C belastbar, jedoch nicht kratzfest. Für orientierende Untersuchungen genügen sie den Anforderungen.

Für höchste Ansprüche kittet man unbeschichtete, polarisationsoptisch wirksame Folien zwischen spannungsfreie, planparallel geschliffene, feinpolierte Deckgläser. Optimale technische Daten sind erreichbar:

Durchlässigkeit für unpolarisiertes weißes Licht: 28%

Durchlässigkeit zweier Filter in Hellstellung: 15%

Durchlässigkeit zweier Filter in Dunkelstellung: 0,00015%

Löschungsvermögen: 1 : 100 000

Polarisationsgrad: Annähernd 100%

Thermische Belastung: 70° C.

Diese hochwertigen Polarisationsfilter sind relativ teuer. Billigere Typen können bei Dunkelstellung eine Durchlässigkeit von maximal 0,5% haben. Der Bilduntergrund ist dann dunkelblau bis blau statt schwarz. Die verkitteten Filter können bei qualitativen Untersuchungen ungefaßt verwendet werden. Sie sollen jedoch randversiegelt sein. Beim Einfassen in normale Filterfassungen treten oft Randspannungen auf, wodurch das Löschungsvermögen der Hochleistungsfilter um mehr als eine Zehnerpotenz absinken kann. Durch gewisse Kunstgriffe werden die Randspannungen beim Bau von Polarisationsmikroskopen weitgehend vermieden.

Das Mikroskop

Für einfache polarisationsoptische Untersuchungen ist jedes Mikroskop geeignet. Als Polarisator legt man ein verkittetes Pol-Filter oder eine Pol-Folie in den Filterträger zwischen Lichtquelle und Kondensator. Ein kleineres Pol-Filter (18—20 mm) wird auf die Sehfeldblende des Okulars gelegt oder mittels einer Steckfassung auf die Augenlinse aufgesteckt bzw. vor der Tubuslinse des binokularen Schrägtubus angebracht. Ein drehbarer Objektstisch ist erforderlich, doch braucht dieser nicht unbedingt eine Gradteilung zu besitzen. Es werden nur achromatische Objektive benutzt,



Bild 2: Kristalle von Kalziumoxalat in der Epidermis der Küchenzwiebel. Links im gewöhnlichen, rechts im polarisierten Licht. Achromat 10×/0,24; Projektiv 8×.

da Planachromate und Apochromate in der Regel nicht frei von Innenspannungen sind. Wünschenswert ist auch eine Vorrichtung, die das Einfügen eines Kompensators Rot I (Gips- oder Quarzplättchen) in den Strahlengang zwischen Präparat und Analysator ermöglicht.

Mit einem so ausgerüsteten Mikroskop wurden die hier gezeigten Aufnahmen hergestellt. Die Bilder beweisen, daß auch mit minimalem Aufwand gute Resultate möglich sind.

Das spezielle Polarisationsmikroskop unterscheidet sich von dem gewöhnlichen durch folgende zusätzliche Bauteile:

Der Polarisator besitzt eine Gradteilung und manchmal auch eine Klinke, die alle 45° einrastet. Auch der Drehtisch ist mit einer Gradteilung versehen, die mit Hilfe von Nonien auf $0,1^\circ$ genau abgelesen werden kann. Die spannungsfreien achromatischen Objektive haben eine Zentrierfaserung. Zwischen Objektiv und Okulartubus befindet sich das Analysator-Zwischenstück, das einen Analysator mit Gradteilung, eine Amici-Bertrandlinse, eine Irisblende und eine verschließbare Öffnung zum Einschieben von Kompensatoren besitzt. Am Tubus des Mikroskops befinden sich Kerben für die Arretierung von Fadenkreuzokularen. Im Gegensatz zum oben beschriebenen improvisierten Polarisationsmikroskop ist dieses Instrument für quantitative polarisationsoptische Analysen geeignet. Bei schwierigen Untersuchungen sind starke Lichtquellen, z. B. eine 12 V/100 W Halogenleuchte, erforderlich.

Wirkungsweise: Das von der Glühbirne emittierte Licht wird vom Kollektor der Mikroskopierleuchte konvergent gemacht und von der Feldblende begrenzt. Es schwingt in allen möglichen Ebenen. Zwischen den einzelnen Wellenzügen bestehen die verschiedensten Phasenverhältnisse. Vom Polarisator wird nur das in einer einzigen Richtung schwingende Licht (Schwingungsrichtung des Filters) durchgelassen. Das andere (etwa 75%) wird absorbiert. Der Kondensor leitet dieses linear polarisierte Licht zum Präparat. Hier wird es von einem anisotropen Objekt in zwei linear polarisierte Teilwellen aufgespalten, deren Schwingungsebenen senkrecht aufeinander stehen. Isotrope und in Richtung zur optischen Achse durchstrahlte anisotrope Objekte, sowie das ebenfalls isotrope

Umfeld (Glas, Einschlußmittel) verläßt das polarisierte Licht jedoch unverändert. Es fällt ins Objektiv und trifft dann auf den Analysator, dessen Schwingungsrichtung mit der des ankommenden unveränderten Lichtes einen Winkel von 90° bildet und es deshalb auslöscht. Das Gesichtsfeld ist an diesen Stellen vollkommen dunkel. Hingegen schwingt das aus den anisotropen Objekten kommende Licht in anderen Richtungen. Fallen diese mit der Schwingungsrichtung des Analysators zusammen, so herrscht maximale Helligkeit. Bilden sie mit ihr einen Winkel von 90° , so wird das Bild des Objektes völlig gelöscht. In den anisotropen Objekten pflanzen sich die polarisierten Teilwellen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit fort. Der Brechungsindex ist in beiden Schwingungsrichtungen unterschiedlich. Sie treten sie mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung (Gangunterschied) aus dem Objekt aus und interferieren miteinander. Aus diesem Grunde ist das Objekt in Hellstellung bei Verwendung von weißem Licht meistens farbig. Die Interferenzfarbe ist von der Größe der Doppelbrechung und der Dicke des Objektes abhängig. Alle Bilder werden mit Okularen üblicher Bauart beobachtet, die nicht spannungsfrei sein müssen.

Anwendungsbeispiele

Bereits mit dem einfachen Polarisationsmikroskop lassen sich an biologischen Objekten viele interessante Erscheinungen beobachten, von denen hier nur wenige aufgeführt werden können. In botanischen Schnitten ist der Gefäßbündelverlauf im polarisierten Licht sehr eindrucksvoll zu sehen. Besonders die Xylemelemente erscheinen leuchtend hell, während die übrigen Gewebe dunkel sind. Die stark doppelbrechende Wirkung verholzter Zellwände zeigt Bild 1. Auch die Speichertracheiden treten durch ihre Doppelbrechung deutlich hervor. Die kristallinen Inhaltsstoffe in manchen Zellen, z. B. Kalziumoxalat, Inulin, Alkaloide usw., können von den amorphen Anteilen sehr gut unterschieden werden (Bild 2). Über Stärkekörnern verschiedenster Art beobachtet man im polarisierten Licht das Sphaeritenkreuz, das auf eine radiäre Anordnung hinweist (Bild 3). Viele Hartgebilde, wie Foraminife-

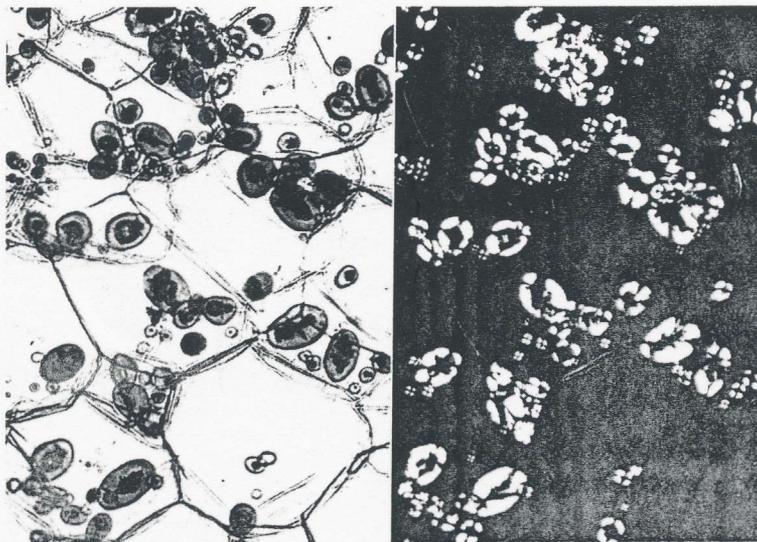


Bild 3: Stärkekörner in der Kartoffelknolle. Links im gewöhnlichen Licht (gefärbt); rechts im polarisierten Licht. Achromat $20\times 0,40$; Projektiv $10\times$.

renschalen, Holothuriensklerite, Nadeln von Kalkschwämmen, Coccolithenplättchen usw., bestehen aus Kalzit oder Aragonit und drehen die Ebene des polarisierten Lichtes (Bilder 4 und 5). Einer Radiolariengruppe mit Gehäusen aus feinmodellierten Cölestinnadeln (Strontiumsulfat) gab Enriques den Namen „Birefrangentia“. Im Gegensatz zu den kieselschaligen Radiolariengehäusen sind sie doppelbrechend. Das ist der einzige Fall in der zoologischen Nomenklatur, daß sich die Aufteilung einer Ordnung auf ein polarisationsoptisches Merkmal stützt.

Vielfältig ist die optische Anisotropie der Proteinstrukturen (Bild 6), zum Beispiel der glatten und quergestreiften Muskulatur, der Neuro- und Gliafibrillen des Nervengewebes, der Tonofibrillen in den Epithelien, der Kollagenfibrillen im Bindegewebe und Knorpelgewebe, sowie der Reticulin- und Elastinfasern. Auch die durch Verspinnen von Sekreten entstehenden Fäden, wie Seide und andere Spinnfäden, ferner Cilien, Geißeln, Wimperwurzeln, Schwanzfäden von Spermien, Filo- und Axopodien von Rhizopoden sowie Kern-, Zell- und Befruchtungsmembranen sind für



Bild 4: *Peneroplis planatus* (Foraminiferengehäuse) im gewöhnlichen und polarisierten Licht. Achromat $10\times/0,24$; Projektiv $8\times$.

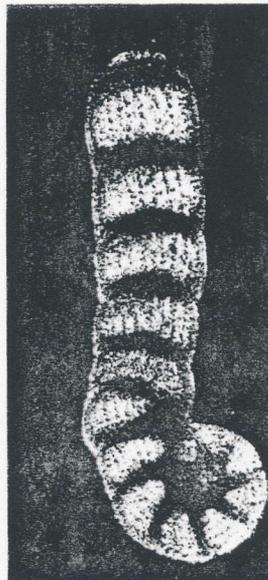
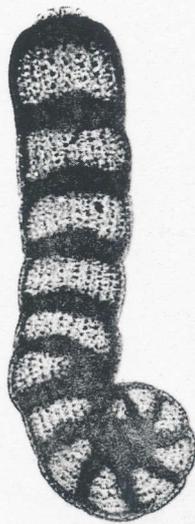


Bild 5: *Spirolina cylindracea* (Foraminiferengehäuse) im gewöhnlichen und polarisierten Licht. Achromat $10\times/0,24$; Projektiv $8\times$.

Man kann das Polarisationsmikroskop auch sehr bequem zur Bilddifferenzierung verwenden, weil sich die verschiedenartigen Anteile der Objekte je nach Stärke der Aufhellung bzw. Auslöschung gut voneinander abheben. Der Kontrast ist etwa so hoch wie bei Verwendung eines Dunkelfeldkondensors, allerdings nur bei doppelbrechenden Objekten. Durch Drehen des Objektisches werden sie unter geeignetes Azimut gebracht. Die Erscheinung doppelbrechender Strukturen hängt auch vom Schnittwinkel ab. Quer geschnittene Myo-, Tono- und Kollagenfibrillen bleiben stets dunkel (=Durchstrahlung in Richtung optischer Achse), während sich längs oder schräg geschnittene in Diagonallage aufhellen.

die polarisationsoptische Untersuchung geeignet. Von den Nukleoproteinstrukturen sollen das Chromatin einiger Zellkerne und der Spermienkopf genannt werden. Viele weitere Eiweißkörper, wie das Kreatin, sind doppelbrechend. Haare, Federn und Fischschuppen liefern im polarisierten Licht brillante Bilder (Bild 7). Auch Polysaccharidstrukturen in chitin- und zellulosehaltigen Objekten sind anisotrop (Bild 8). Lipoidstrukturen finden wir z. B. bei den Stäbchen der Netzhaut, der Markscheide des Nerven, den Mitochondrien und dem „Dotterkern“ im Spinnenei.

Will man alle doppelbrechenden Elemente eines Präparates unabhängig von ihrem Azimut *gleichzeitig* darstellen, so verwendet man *zirkular* polarisiertes Licht. Eine $\lambda/4$ -Platte wird unter dem Objekt, eine zweite über dem Objekt (beide in Diagonallage) angeordnet. Anstelle der teuren Glimmer-Plättchen können auch die billigeren $\lambda/4$ -Kunststoff-Folien verwendet werden. Es gibt auch zwischen Deckgläsern verkittete Kompensationsfolien sowie verkittete Polarisatoren für zirkular polarisiertes Licht, die neben der Polarisationsfolie eine $\lambda/4$ -Folie enthalten. Bei dieser Anordnung fallen alle Auslöschungerscheinungen aus, so daß nur optisch isotrope Objekte und anisotrope längs zur optischen Achse dunkel bleiben. Das häufig zu beobachtende Sphaeritenkreuz, ein besonderes Merkmal für linear polarisiertes Licht, fehlt bei der Verwendung von *zirkular* polarisiertem Licht. Diese Aufzählung von Erscheinungen biologischer Objekte im polarisierten Licht ist keineswegs vollständig. Sie soll nur den

Wert des Polarisationsmikroskopes für die biologische Forschung unterstreichen. Mit diesem Instrument sind neben den hier beschriebenen qualitativen Beobachtungen auch quantitative Untersuchungen möglich, die im zweiten Teil dieses Beitrages ausführlich behandelt werden.

Literaturhinweise:

1. Burri, C.: Das Polarisationsmikroskop. Basel 1950.
2. Haas, H.: Polarisationsoptik. Berlin 1953.
3. Pfeiffer, H.: Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin. Braunschweig 1949.
4. Rinnc, F. u. M. Berek: Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop. Stuttgart 1953.
5. Schmidt, W. J.: Anwendung der Polarisationsmikroskopie in der Histochemie. Hbd. d. Histochemie Bd. II. Stuttgart 1958.
6. Schmidt, W. J.: Polarisationsoptische Erforschung tierischer Zellen und Gewebe. Verh. Deutsch. Zool. Ges. Rostock 1939.
7. Wiener, O.: Die Theorie des Mischkörpers für das Feld der stationären Strömung. Abh. Sächs. Ges. Wiss. 32, 507 (1912).

2. Quantitative Untersuchungen

Unterscheidung optisch isotroper und anisotroper Objekte

Zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern bleibt ein isotropes, durchsichtiges Objekt bei Drehung des Objektisches um 360° in jeder Lage und bei jeder Schnittrichtung unsichtbar. Hingegen wird ein optisch anisotropes Objekt bei einer vollen Umdrehung des Objektisches viermal hell und viermal dunkel (Auslöschstellungen). In den dazwischen liegenden Stellungen erscheint es mehr oder weniger aufgehellt. Optisch anisotrope Objekte verhalten sich jedoch ebenfalls isotrop, wenn sie in Richtung ihrer optischen Achse durchstrahlt werden.

Bestimmung des Vorzeichens der Doppelbrechung

Man unterscheidet das wahre Vorzeichen vom relativen Vorzeichen der Doppelbrechung. Das wahre Vorzeichen wird durch die Lage der Indikatrix zur optischen Achse des doppelbrechenden Körpers bestimmt. Ermittelt wird die Differenz zwischen den Brechzahlen für den ordentlichen (n_o) und außerordentlichen Strahl (n_A). Man spricht von *positiver Doppelbrechung*, wenn $n_A - n_o$ einen positiven Wert ergibt. Um *negative Doppelbrechung* handelt es sich, wenn $n_A - n_o$ einen negativen Wert liefert. Bei biologischen Objekten ist die Bestimmung der Lage der optischen Achse in der Regel schwierig. Deshalb verwendet man hier das relative Vorzeichen der Doppelbrechung, das sich im allgemeinen auf eine morphologisch ausgezeichnete Richtung bezieht. Bei Fasern wählt man die Faserlängsachse, bei Membranen die Flächennormale und bei kugelförmigen Körpern den Radius der Bezugsrichtung.

Methode I:

1. Genaue Durchführung des Köhlerschen Beleuchtungsverfahrens.
2. Abdunkeln des Raumes zur Adaption des Auges.
3. Kreuzung der Polarisatoren durch Drehen des Analysators bis zur maximalen Dunkelheit (ohne Präparat).
4. Gesichtsfeld durch Drehen des Analysators etwas aufhellen. Präparat auf den Objektisch legen und scharf einstellen. Gewünschte Stelle in die Gesichtsfeldmitte bringen. Gesichtsfeld mit einem Wrightschen Okular (falls vorhanden) einengen. Durch Drehen des Analysators wieder maximale Dunkelheit des Umfeldes herbeiführen.
5. Objekt durch Drehen des Objektisches in Normallage (= Auslöschstellung) bringen.
6. Objektisch um genau 45° drehen. Das Objekt zeigt jetzt maximale Helligkeit.
7. Kompensator Rot I (Gips- oder Quarzplättchen) unter den Analysator einschieben und n_γ (auf dem Plättchen markiert) im Gesichtsfeld von links unten nach rechts oben orientieren ($+45^\circ$). Das Umfeld erscheint purpurrot.

Ergebnis: Objekte mit einem Gangunterschied von 20 bis 200 nm nehmen eine mehr oder weniger intensive blaue bzw. gelbe Farbe an. Ist der Gangunterschied sehr gering, so tritt nur eine Farbverschiebung in Richtung Violett bzw. Orange auf.

Auswertung: Blaues Objekt (= Additions-lage) bei positivem Vorzeichen der Doppelbrechung. Gelbes Objekt (= Subtraktions-lage) bei negativem Vorzeichen der Doppelbrechung.

Methode II:

Anstelle des Rot-I-Plättchens wird das $\lambda/4$ -Plättchen (Glimmer) eingesetzt. Das Ge-

sichtsfeld erscheint nicht rot, sondern grau. Das zu prüfende Objekt ist jetzt entweder abgedunkelt (grau bis schwarz) oder erscheint heller als ohne $\lambda/4$ -Plättchen.

Auswertung: Objekt aufgehellt (= Additionslage) bei positivem Vorzeichen der Doppelbrechung. Objekt abgedunkelt (= Subtraktionslage) bei negativem Vorzeichen der Doppelbrechung.

Es gibt noch empfindlichere Methoden, zum Beispiel mit Drehkompensatoren, die jedoch im Rahmen dieses Beitrages nicht beschrieben werden können.

Ursachen der optischen Anisotropie biologischer Objekte

Die charakteristischen Veränderungen, denen das Licht beim Durchdringen eines anisotropen Objektes unterworfen ist, werden von der submikroskopischen Struktur der Objekte verursacht. Hier kann nur auf die wesentlichen Bauprinzipien, die bei biologischen Objekten eine Rolle spielen, eingegangen werden.

Im submikroskopischen Bereich bestehen die biologischen Objekte aus einem System von Molekülen bzw. Makromolekülen, zwischen denen sich Lücken befinden, die mit anderen Substanzen gefüllt sind. So können zum Beispiel die Gefügelücken eines Systems von Polypeptiden, Polysacchariden oder Polynukleotiden, von Lipiden oder wäßrigen Lösungen ausgefüllt werden. Zum Verständnis dient die Wienersche Mischkörpertheorie, allerdings mit Einschränkungen, weil die Elemente des Mischkörpers zueinander echte Phasengrenzen besitzen müssen. Nach Wiener (1912) besteht ein Mischkörper aus einem System anisodiametrischer Elemente, deren Abstände voneinander im Vergleich zur Lichtwellenlänge sehr klein und außerdem durch ein Medium von abweichender Brechzahl voneinander getrennt werden. Es spielt dabei keine Rolle, ob beide Anteile isotrop bzw. anisotrop sind oder der eine isotrop und der andere anisotrop ist. Selbst wenn beide Anteile isotrop sind, kann sich der Mischkörper anisotrop verhalten. Diese Art von Doppelbrechung, die auf der charakteristischen Bauweise des Mischkörpers beruht, bezeichnet man als *Formdoppelbrechung*.

Wiener unterscheidet zwei Typen von Mischkörpern:

1. den *Schichtenmischkörper*, der aus parallel liegenden Platten von unterschiedlicher Brechzahl besteht. Die optische Achse verläuft parallel zur Flächennormalen. Er verhält sich wie ein optisch einachsiger, *negativ* doppelbrechender Körper.

2. den *Zylindermischkörper*, der aus parallel liegenden Zylindern besteht, die durch ein Medium abweichender Brechzahl getrennt sind. Die optische Achse verläuft parallel zur Zylinderlängsachse. Er verhält sich wie ein optisch einachsiger, *positiv* doppelbrechender Körper.

Eigendoppelbrechung liegt in einem Mischkörper dann vor, wenn das Gefüge selbst Doppelbrechung zeigt. Sie ist als charakteristische Materialkonstante aufzufassen und wird durch die kristalline Konfiguration eines im Mischkörper vorkommenden Strukturelementes hervorgerufen.

Die *Gesamtdoppelbrechung* eines Mischkörpers setzt sich aus seiner *Eigendoppelbrechung* und der *Formdoppelbrechung* zusammen.

Ob ein Objekt *Formdoppelbrechung*, *Eigendoppelbrechung* oder *Formdoppelbrechung* und *Eigendoppelbrechung* (= *Gesamtdop-*

pelbrechung) aufweist, kann mit Hilfe des von Ambronn beschriebenen Imbibitionsverfahrens festgestellt werden. Man durchtränkt das Präparat mit unterschiedlichen Flüssigkeiten, deren Brechzahlen bekannt sind. Die Gefügelücken werden vom Imbibitionsmedium ausgefüllt. Bei kontinuierlicher Änderung der Brechzahl erreicht man den Punkt, für den die Brechzahl des Imbibitionsmediums der Brechzahl des Gefüges entspricht. Es ist dann keine *Formdoppelbrechung* mehr feststellbar. Zeigt das Gefüge jedoch *Eigendoppelbrechung*, so verschwindet die *Formdoppelbrechung*, wenn die Brechzahl des Imbibitionsmediums dem Mittelwert aus beiden Brechzahlen des doppelbrechenden Gefüges entspricht. Haben *Form-* und *Eigendoppelbrechung* gleiches Vorzeichen, dann bleibt das Vorzeichen der *Gesamtdoppelbrechung* beim Versuch unverändert. Bei entgegengesetzten Vorzeichen kehrt sich das Vorzeichen der *Gesamtdoppelbrechung* zweimal um, wobei im Übergangsbereich anomale Polarisationsfarben auftreten.

Diese Regeln gelten nur für nichtabsorbierende Mischkörper. Ist die Absorption eines Bestandteiles des Mischkörpers genügend groß, so kann selbst bei gleichen Brechzahlen *Formdoppelbrechung* eintreten. Auch das Vorzeichen der *Doppelbrechung* kann sich ändern, wenn ein Bestandteil des Mischkörpers Licht absorbiert.

Beispiele

Die Zellulosemicelle bildet ein System von optisch anisotropen kristallähnlichen Stäbchen, deren Abstände voneinander gegenüber den Lichtwellenlängen klein sind. Die Intermicellarsubstanz hat einen anderen Brechungsindex als die Micelle. Somit ist die doppelbrechende Wirkung der Xylemzellwände aus *Eigendoppelbrechung* und *Formdoppelbrechung* zusammengesetzt. Letztere kommt durch den abweichenden Brechungsindex der Intermicellarsubstanz zwischen den sehr dicht zusammenstehenden anisodiametrischen Zelluloseteilchen zustande. Das dunkle Kreuz (Sphaeritenkreuz), das oft über den einzelnen Zellen liegt (Bild 1) und auch beim Drehen des Präparates in seiner Lage bleibt, deutet auf eine radiäre Ordnung der Micelle um die Zellachse.

Dispersion der Doppelbrechung

Wie bereits erwähnt, wird die Stärke der *Doppelbrechung* durch die Differenz der beiden Brechzahlen zahlenmäßig ausgedrückt. Die Größe der jeweiligen Brechzahl ist jedoch von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes abhängig. Deshalb ist auch die Differenz der Brechzahlen wellenlängenabhängig. Diese Abhängigkeit der Stärke der *Doppelbrechung* von der Wellenlänge bezeichnet man als *Dispersion der Doppelbrechung*. Da wir *Eigendoppelbrechung* und *Formdoppelbrechung* unterscheiden können, sind auch eine *Dispersion der Eigendoppelbrechung* und eine *Dispersion der Formdoppelbrechung*, sowie eine *Dispersion der Gesamtdoppelbrechung* zu beobachten. Diese Erscheinungen haben für unsere Untersuchungen keine sehr große Bedeutung und werden hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

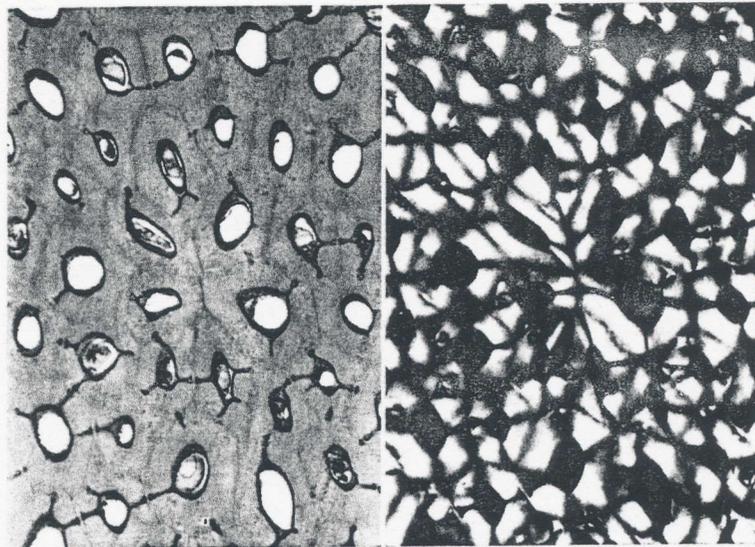


Bild 1: Steinnuß
(Endocarp) quer.
Links im gewöhnlichen,
rechts im polarisierten Licht.
Achromat 20×/0,40;
Projektiv 8×.

Untersuchung des Dichroismus

Dichroismus liegt vor, wenn das in einer bestimmten Bezugsrichtung schwingende Licht stärker oder schwächer absorbiert wird als das andere. Wie bei der Formdoppelbrechung spricht man von *Formdichroismus*, wenn sich die Absorptionskoeffizienten der zwei Bestandteile des Wienerschen Mischkörpers voneinander unterscheiden. Positiver Formdichroismus liegt vor, wenn die absorbierende Komponente des Mischkörpers eine höhere Brechzahl hat als die nicht absorbierende Komponente. Negativer Formdichroismus ist vorhanden, wenn die Verhältnisse genau umgekehrt sind. Neben dem Formdichroismus kann auch *Eigendichroismus* beobachtet werden, wenn im submikroskopischen Bereich eine bevorzugte Richtung dichroitischer Substanzen vorliegt. Zeigt die Struktur selbst Dichroismus, so spricht man von natürlichem Dichroismus. Künstlicher Dichroismus entsteht, wenn in den submikroskopischen Lückenraum absorbierende Substanzen bzw. dichroitische Farbstoffe eingelagert werden.

Für die praktische Bestimmung des Vorzeichens des Dichroismus gelten folgende Grundregeln: Positiver Dichroismus liegt vor, wenn das parallel zur gewählten Bezugsrichtung schwingende Licht stärker absorbiert wird als das senkrecht dazu schwingende. Wenn jedoch das senkrecht zur gewählten Bezugsrichtung schwingende Licht stärker absorbiert wird als das parallel dazu schwingende, liegt negativer Dichroismus vor.

Nachweis dichroitischer Substanzen:

1. Der Polarisator wird entfernt und das Präparat nach dem Köhlerschen Prinzip scharf eingestellt.
2. Interferenzfilter mit gewünschter Wellenlänge in den Filterträger einsetzen. Zur Ausschaltung störender Polarisationserscheinungen zusätzlich Mattglas einsetzen.
3. Analysator drehen und Helligkeitsänderungen des Objektes beobachten. Bei Intensitätsschwankungen in den beiden Analysatorstellungen (90°) liegt Dichroismus vor.

Der Nachweis des Dichroismus gelingt auch, wenn statt des Analysators der Polarisator verwendet wird oder wenn man das Objekt anstelle des Analysators bzw. Polarisators dreht. Besonders empfindlich ist das Verfahren nach Zoher und Jacoby (1927): Polarisator und Analysator werden gekreuzt, wobei die Schwingungsrichtung des Polarisators von Nord nach Süd verlaufen soll. Das Untersuchungsobjekt wird mit seiner Bezugsrichtung unter $+45^\circ$ orientiert, wobei man ein Fadenkreuzokular benutzt. Für die Auswertung im monochromatischen Licht gilt die Regel:

- A. Drehung des Analysators im Gegenuhreigersinn führt zur Verdunkelung des Objektes. Es liegt *positiver Dichroismus* vor.
- B. Drehung des Analysators im Uhrzeigersinn führt zur Verdunkelung des Objektes. Es liegt *negativer Dichroismus* vor.

Beim Drehen des Polarisators gilt das gleiche für entgegengesetzten Drehsinn. Quantitative Untersuchungen des Dichroismus werden mit einem Dichroskopokular durchgeführt, auf dessen Beschreibung hier verzichtet wird.

Anwendungsbeispiele

Im allgemeinen zeigen biologische Objekte nur dann natürlichen Dichroismus, wenn sie optisch anisotrop sind. Die dichroitischen Erscheinungen lassen Rückschlüsse auf die Struktur des Untersuchungsobjektes und auf die Ein- bzw. Anlagerung des Farbstoffes zu. Eine Unterscheidung von Form- und Eigendichroismus ist mit Hilfe der Imbibitionsmethode möglich. Man durchtränkt das dichroitische Objekt mit Imbibitionsflüssigkeiten (z. B. Glycerin) verschiedener Brechzahlen. Bei reinem Formdichroismus gibt es einen Punkt, in dem die Brechzahl der Imbibitionsflüssigkeit so gewählt ist, daß der Dichroismus verschwindet.

Künstlicher Formdichroismus kann durch Einlagerung von Metallen oder Farbstoffen in den Gefügelücken hervorgerufen werden. Bei der Analyse der Verlauffrichtung von Faserproteinen innerhalb des Gewebes spielen dichroitische Färbungen eine

große Rolle. Bei Beobachtung in weißem, linear polarisiertem Licht erscheinen die Fasern je nach Schwingungsrichtung in einer anderen Farbe. Der Dichroismus kann auch zur Unterscheidung verschiedener Strukturen herangezogen werden, zum Beispiel bei der Abgrenzung von Kollagen gegenüber Retikulिन. Mit Eosin oder Toluidinblau gefärbte Kollagenfasern zeigen Dichroismus, während diese Erscheinung bei retikulären Fasern nicht auftritt. Die Einlagerung von Gold, Silber, Kupfer, Tellur, Arsen, Antimon oder Wismut in Gefügelücken bewirkt künstlichen Formdichroismus. Folgende Methoden sind besonders zu empfehlen:

A. Entparaffinierte Schnitte mindestens 24 h in folgende, gut gemischte Lösung legen:

Dest. Wasser 500 ml
98%iges Hydrazinhydrat 1 Tropfen
10%ige wäßrige Goldchloridlösung 3 Tropfen

Wenn die Lösung blaurot erscheint, ist die Behandlung beendet. Anschließend werden die Schnitte gewässert, getrocknet und in Caedax eingeschlossen. Im weißen Licht ist blau-roter Dichroismus zu beobachten. B. Entparaffinierte Schnitte 3 h in 1%ige wäßrige Silbernitratlösung bringen. Mit dest. Wasser abspülen und 10 Minuten in eine Lösung von 50 ml dest. Wasser und 7 Tropfen 98%ige Hydrazinhydratlösung legen. Anschließend wässern, trocknen und in Caedax einschließen. Je nach Objekt ist der Dichroismus grau-gelb, dunkelbraun-hellbraun oder graugrün-hellgelb. Bei der Versilberung nach Gomori (Romeis 1968) entsteht der Dichroismus blaurot-gelbrot. Für dichroitische Färbungen sind folgende Farbstoffe geeignet: Akridinorange, Amidoschwarz 10 B, Anilinblau, Azur A, Coriophosphin O, Chromotrop 2 R, Eosin, Evansblau, Fastgreen, Gentianaviolett, Janusgrün B, Kongorot, Kresylviolett, Methylenblau, Nilblau, Orange G, Rivanol, Safranin O, Toluidinblau u. a. (s. Zocher und Jacoby 1927). Der Mikroskopiker findet hier ein

weites Arbeitsfeld, zumal dichroitische Färbungen in Abhängigkeit vom Farbstoff nicht an jedem Objekt gelingen. Proteinfasern aller Art, aber auch Zellulosefasern sind für solche Versuche geeignet. Die im Gewebe auftretenden Faserproteine (Kollagen, Retikulिन, Elastin, Fibrin, Gliafasern, Zonulafasern, Linsenfaser, Neuro-, Tono- und Myofibrillen der glatten, Herz- und Skelettmuskulatur) sind optisch anisotrop und deshalb für polarisationsoptische Untersuchungen besonders gut verwendbar. Abschließend soll noch der Wert des Polarisationsmikroskops bei der histologischen Diagnosestellung erwähnt werden. Bei Silikosen liegen im Gewebe doppelbrechende Quarzkristalle vor. Auch bei Silikatosen können optisch anisotrope Kristalle beobachtet werden. Ein bewährtes Verfahren zur Gichtdiagnose ist die polarisationsoptische Untersuchung der Gelenkflüssigkeit. Bei Gicht treten im Ausstrich negativ doppelbrechende Kristallnadeln von Mononatriumurat auf. Auch bei vielen Formen der Steinbildungen liefert die polarisationsoptische Untersuchung der Kristalle zusätzliche Informationen. In der forensischen Toxikologie wurde das Polarisationsmikroskop mit Erfolg eingesetzt, weil die hier interessierenden Stoffe oft Kristallklassen angehören, die durch relativ viele Parameter zu charakterisieren sind.

Literaturhinweise:

1. *Ambronn, H.*: Über Stäbchendoppelbrechung im Zelloidin und in der Gelatine. *Z. wiss. Mikroskopie* 32, 43 (1915).
2. *Frey, A.*: Die Technik der dichroitischen Metallfärbungen. *Z. wiss. Mikroskopie* 42, 421 (1925).
3. *Frey-Wyssling, A.*: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Berlin 1938.
4. *Scheuner, G. u. J. Hutschenreiter*: Polarisationsmikroskopie in der Histophysik. Leipzig 1972.
5. *Schmidt, W. J.*: Dichroitische Färbung tierischer und pflanzlicher Gewebe. In: *Abderhaldens Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden* Abt. 5, Teil 10. Berlin und Wien 1932.
6. *Schnabel, R.*: Der Färbedichroismus der Gliafibrillen. *Histochemie* 3, 257 (1963).

Verfasser: Gerhard Göke, Bahnhofstr. 27, 5800 Hagen.

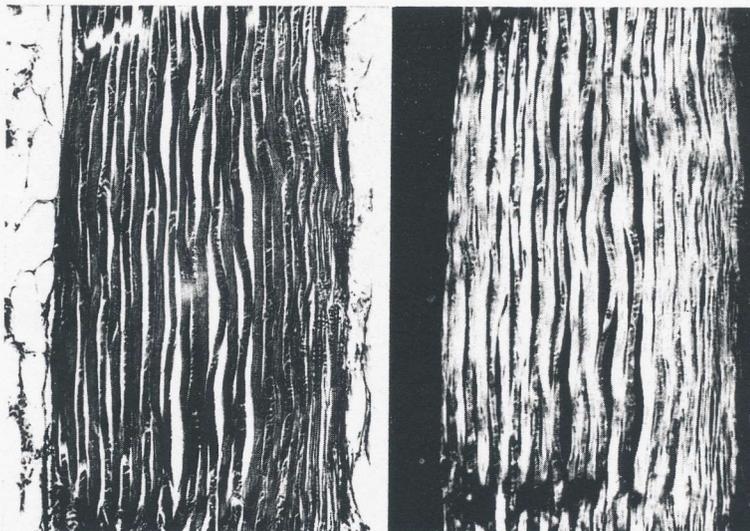


Bild 2: Proteinfasern in der Haut des Karpfens, dichroitisch gefärbt. Links im gewöhnlichen, rechts im polarisierten Licht. Achromat 20×/0,40; Projektiv 8×.

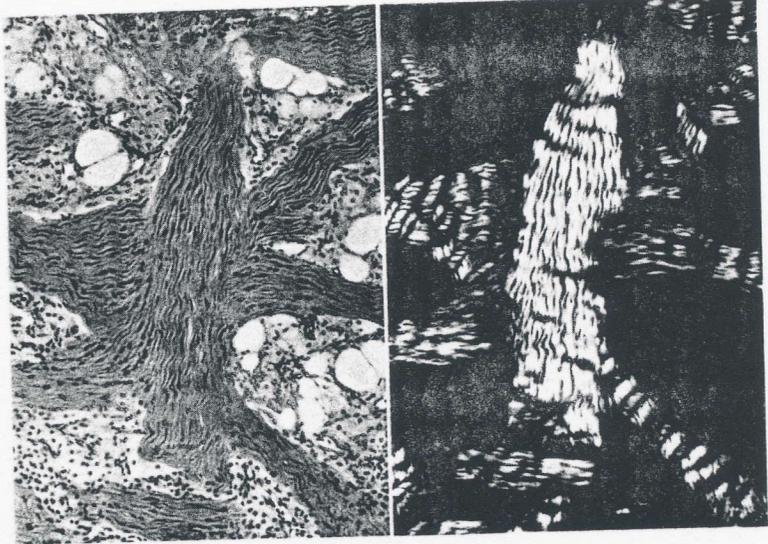


Bild 3: Kollagene Fasern im Penis des Hausschweines (Hämatoxylin-Eosin). Links im gewöhnlichen, rechts im polarisierten Licht. Achromat $20\times/0,40$; Projektiv $10\times$.

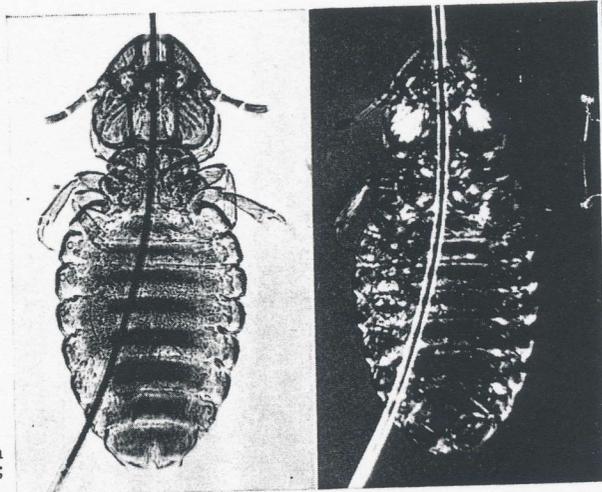


Bild 4: Mallophage (Haarling) im gewöhnlichen und polarisierten Licht. Planachromat $2,5\times/0,08$; Projektiv $8\times$.



Bild 5: Bryozoenstock (Zooarium) im gewöhnlichen und polarisierten Licht. Planachromat $2,5\times/0,08$; Projektiv $8\times$.

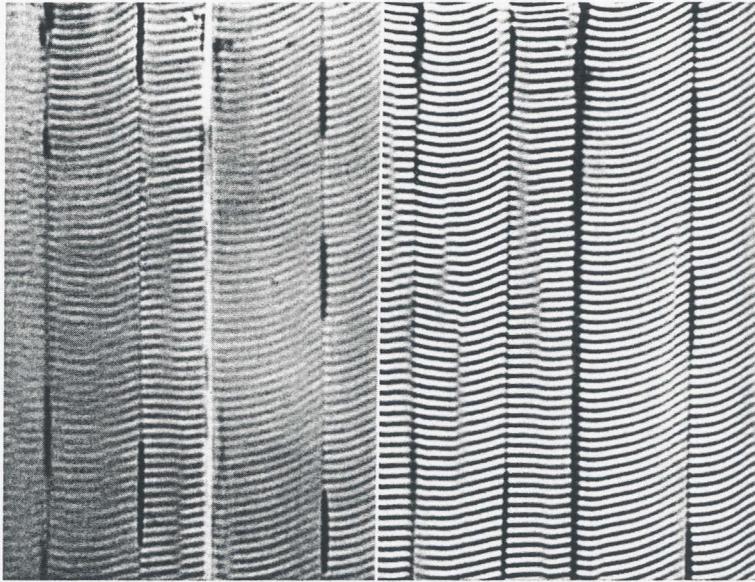


Bild 6: Quergestreifter Skelettmuskel des Menschen (gefärbt). Links im gewöhnlichen, rechts im polarisierten Licht. Achromat $40\times/0,65$; Projektiv $10\times$.

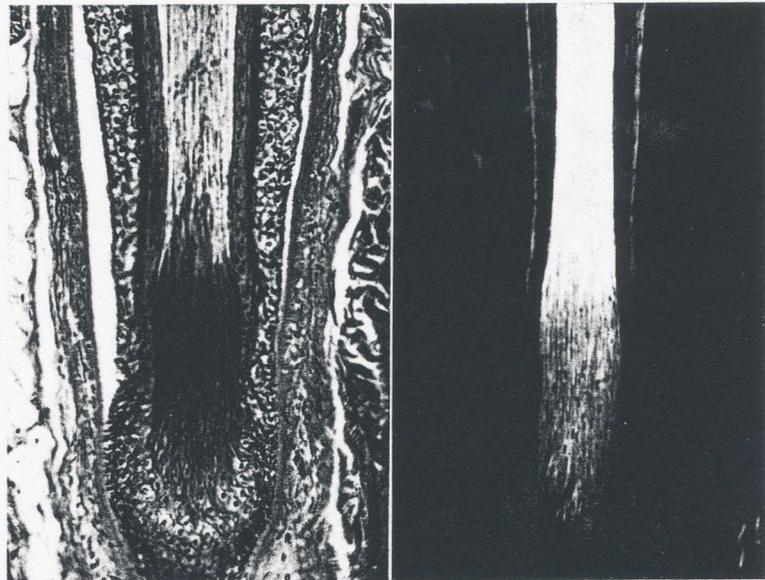


Bild 7: Haar in der Kopfhaut des Menschen (Azanfärbung). Links im gewöhnlichen, rechts im polarisierten Licht. Achromat $40\times/0,65$; Projektiv $8\times$.

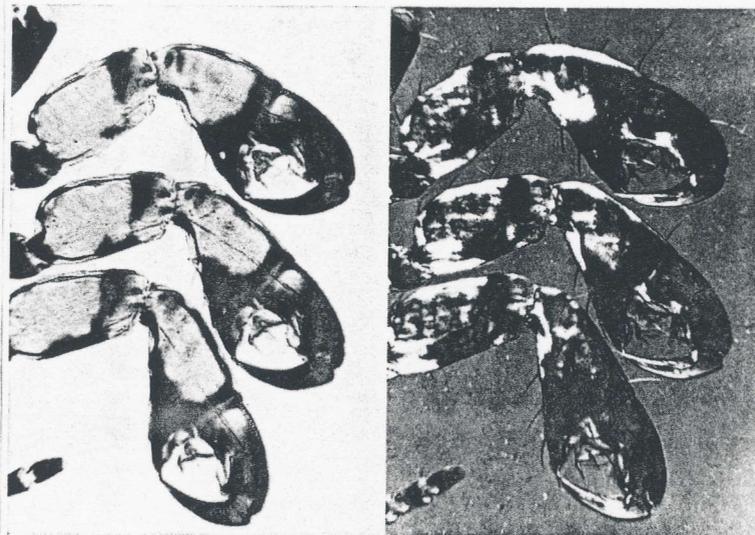


Bild 8: Beine der Schweinelaus im gewöhnlichen und polarisierten Licht. Planachromat $2,5\times/0,08$; Projektiv $8\times$. (Der Planachromat ist nicht frei von Spannungen und ermöglicht keine totale Auslöschung des isotropen Umfeldes.)

1. Begriffe und Grundbeziehungen der Polarisationsoptik

Elektrischer Feldvektor E:	Liegt in einer Ebene orthogonal zur Ausbreitungsrichtung Z einer elektromagnetischen Welle. Bestimmt Ort und Intensität des elektrischen Feldes.
Magnetischer Feldvektor H:	Liegt in einer Ebene orthogonal zur Ausbreitungsrichtung Z einer elektromagnetischen Welle im rechten Winkel zum E-Vektor und bestimmt Ort und Intensität des magnetischen Feldes.
Schwingungsrichtung:	Ist gleich der Richtung des E-Vektors. Entgegen früherer Darstellungen wird diese Richtung heute als Polarisationsrichtung bezeichnet.
Durchlaßrichtung eines Polarisators:	In Durchlaßrichtung schwingendes Licht wird wenig absorbiert, d. h. hoher Transmissionsgrad τ_{pol} . Der E-Vektor des einfallenden Lichts und die Durchlaßrichtung des Polarisators stehen parallel zueinander.
Sperrichtung eines Polarisators:	In Sperrichtung schwingendes Licht wird vom Polarisator stark absorbiert. Es ergibt sich der niedrige Transmissionsgrad τ_{sperr} . Der E-Vektor des einfallenden Lichts und die Durchlaßrichtung des Polarisators stehen senkrecht zueinander.
Löschungsvermögen eines Polarisators (Extinktion):	Das Verhältnis aus maximalem Transmissionsgrad τ_{pol} und minimalem Transmissionsgrad τ_{sperr} , gemessen gegen vollständig linear polarisiertes Licht.
Hellstellung	Stellung zweier Polarisatoren, deren Durchlaßrichtungen parallel zueinander orientiert sind.
Dunkelstellung:	Stellung zweier Polarisatoren, deren Durchlaßrichtungen senkrecht zueinander orientiert sind.
Löschungsvermögen:	Das Verhältnis aus maximaler zu minimaler Transmission zweier gleicher Polarisatoren, ermittelt in Hell- und Dunkelstellung.

Folgende Zusammenhänge ergeben sich bei der Anwendung **eines Polarisators**.

Transmissionsgrad τ für unpolarisiertes Licht:

$$\tau = \frac{\tau_{\text{pol}} + \tau_{\text{sperr}}}{2} \approx \frac{\tau_{\text{pol}}}{2} \quad (1.1)$$

Polarisationsgrad P für unpolarisiertes Licht:

$$P = \frac{\tau_{\text{pol}} - \tau_{\text{sperr}}}{\tau_{\text{pol}} + \tau_{\text{sperr}}} \quad (1.2)$$

Extinktion E:

$$E = \frac{\tau_{\text{pol}}}{\tau_{\text{sperr}}} \quad (1.3)$$

Für die Anwendung **zweier gleicher Polarisatoren** gilt:

Transmission für unpolarisiertes Licht in Hellstellung:

$$\tau_{0^\circ} = \frac{\tau_{\text{pol}}^2 + \tau_{\text{sperr}}^2}{2} \approx \frac{\tau_{\text{pol}}^2}{2} \quad (1.4)$$

Transmission für unpolarisiertes Licht in Dunkelstellung:

$$\tau_{90^\circ} = \tau_{\text{pol}} \cdot \tau_{\text{sperr}} \quad (1.5)$$

Löschungsvermögen LV:

$$LV = \frac{\tau_{0^\circ}}{\tau_{90^\circ}} = \frac{\tau_{\text{pol}}^2 + \tau_{\text{sperr}}^2}{2 \cdot \tau_{\text{pol}} \cdot \tau_{\text{sperr}}} \approx \frac{\tau_{\text{pol}}}{2 \cdot \tau_{\text{sperr}}} \quad (1.6)$$

Umgekehrt ergibt sich für **einen Polarisator** wenn T_{0° und T_{90° **zweier gleicher Polarisatoren** bekannt ist:

Transmission für in Sperrichtung schwingendes Licht:

$$\tau_{\text{sperr}} = \sqrt{\tau_{0^\circ} - \sqrt{\tau_{0^\circ}^2 - \tau_{90^\circ}^2}} \quad (1.7)$$

Transmission für in Durchlaßrichtung schwingendes Licht:

$$\tau_{\text{pol}} = \sqrt{\tau_{0^\circ} + \sqrt{\tau_{0^\circ}^2 - \tau_{90^\circ}^2}} \approx \sqrt{2\tau_{0^\circ}} \quad (1.8)$$

Polarisationsgrad P nach Durchlaufen eines Polarisators:

$$P \approx \frac{2 \cdot LV - 1}{2 \cdot LV + 1} \quad (1.9)$$