

Twee moderne methoden van histologisch onderzoek

door Dr. M. T. Jansen, arts

I

De tandheelkundige vakliteratuur bevat op gezette tijden artikelen van meer wetenschappelijk dan direct praktisch belang. De schrijvers van deze stukken menen terecht dat zij niet kunnen volstaan met publicatie van hun resultaten in de kringen van hun wetenschappelijk specialisme doch ook van hun streven verslag moeten uitbrengen in periodieken als het Tijdschrift voor Tandheelkunde.

Het is de bedoeling van deze regels, dat zulke auteurs althans op twee gebieden, dat der electronen-microscopie en dat van het onderzoek met radio-actieve isotopen, zullen mogen rekenen op een wat grotere schaar van belangstellende en begrijpende lezers.

Electronen-microscopie

De electronen-microscopie is geboren uit een ontevredenheid over de prestaties van het lichtmicroscop. Waarom?

In de microscopie gaat het niet zozeer om de mate van vergroting die bereikbaar is als wel om het oplossende vermogen van de apparatuur. Met het lichtmicroscop zijn de fantastische vergrotingsgetallen, bekend uit de onderschriften van electronen-microscop-opnamen, heel wel te verwezenlijken, doch zij hebben in het geval van de lichtmicroscopie geen zin. Immers, het oplossende vermogen, het vermogen om fijne details natuurgetrouw weer te geven, van het lichtmicroscop is van dien aard, dat bij een vergroting van $1000 \times$ het menselijke oog reeds alles kan zien wat er te zien valt. Bij sterkere vergroting worden diezelfde details wel groter doch vager van contour en nieuwe, nog fijnere worden niet zichtbaar. Vergroting boven $1000 \times$ bij microscopie met zichtbaar licht is „lege” vergroting, even zinloos als overdreven sterke vergroting van een fotografisch negatief.

Bij die vergroting van $1000 \times$ kunnen wij twee puntvormige objecten op een onderlinge afstand van 0.0002 mm van elkaar gescheiden zien. Wij zeggen, het oplossende vermogen van het lichtmicroscop is 0.0002 mm. Alle objecten, die dichter bijeen liggen zijn niet gescheiden van elkaar te zien, te *onderscheiden*, ook al voeren wij de vergroting ook nog zover op.

Primair is dus voor elk microscop het *oplossende vermogen*. De vergroting is volmaakt secundair en wordt zo sterk gekozen dat wij met ons oog de opgeloste details zonder moeite kunnen zien; niet sterker.

Is het denkbaar, dat in de toekomst het oplossende vermogen van het lichtmicroscop zal toenemen door verbetering van de optiek? Neen, want de genoemde grens van 0.0002 mm hangt samen met de golflengte van het licht waarbij wij zien kunnen, niet met technische tekortkomingen van onze lenzen.

Afbeelding van voorwerpen is slechts mogelijk wanneer de voorwerpen in de lichtgolven een verstoring teweeg brengen. Details, kleiner dan 0.0002 mm worden door de lichtgolven *omspoeld*, zij geven niet een dusdanige verstoring van de lichtgolven dat zij kunnen worden afgebeeld. Men moet bij het streven naar een groter oplossend vermogen omzien naar „licht” met geringere golflengte, immers, het is te verwachten dat korte golven eerder zullen worden verstoord door fijne details dan lange. Op grond van deze overweging begon men in de eerste jaren van deze eeuw de microfotografie met ultraviolet licht. De golflengte van het hiervoor gebruikte ultraviolette licht bedraagt ongeveer de helft van de gemiddelde golflengte van zichtbaar licht en er is theoretisch een tweevoudige toename in het oplossende vermogen te verwachten. Er zijn tal van technische en praktische moeilijkheden bij de uitvoering van ultraviolet-microfotografie en de winst is betrekkelijk gering. In ieder geval heeft deze techniek in dit opzicht geen grote opgang gemaakt.

Veel beter werden de kansen toen men aan het eind van de dertiger jaren electronenstralen voor de afbeelding van kleine objecten leerde benutten. De theorie leert, dat een bundel snel zich voortbewegende electronen beschouwd kan worden als een bundel „licht” van zéér kleine golflengte. Deze golflengte kan ongeveer een honderd-duizendste deel bedragen van die van het zichtbare licht. De theoretisch te verwachten toename van het oplossende vermogen is enorm. In de praktijk komt men tegenwoordig tot een oplossend vermogen van ongeveer 0,000.002 mm. Het oplossende vermogen van een electronen-microscop is dus rond $100 \times$ zo groot als dat van het lichtmicroscop.

Het is hier niet de plaats in te gaan op de uitvoering van het electronenmicroscop. Ik volsta met te vermelden dat alle onderdelen van het lichtmicroscop er in worden teruggevonden, zij het in volmaakt onherkenbare vorm: er is een „lichtbron” in de vorm van een apparaat dat electronen levert en met grote snelheid in de richting van het object zendt, en er is een condensor, een objectief en een „oculair”, doch de lenzen van deze optiek zijn niet anders dan zorgvuldig berekende magnetische of electrostatische velden, die de langssnellende electronen in de voorgeschreven banen leiden.

„Zien” kunnen wij met het electronenmicroscop slechts indirect. Wij kunnen het electronenbeeld zichtbaar maken op een fluorescentiescherm of wel door middel van de fotografische plaat. De relatie tussen het object en de electronen-optische foto is in principe zeer eenvoudig: door het object verstrooide electronen doen niet mee aan de afbeelding en veroorzaken dus geen zwarting van de plaat. Dikke delen van het object verstrooien de electronenbundel in sterkere mate dan dunne. Ook de samenstelling van het object is van invloed op het vermogen tot strooiing: zware atomen veroorzaken een sterkere verstrooiing van de electronen dan lichte.

Voor een goed begrip van de electronenmicrofotografieën, die wetenschappelijke publicaties steeds meer gaan illustreren, heeft men aan

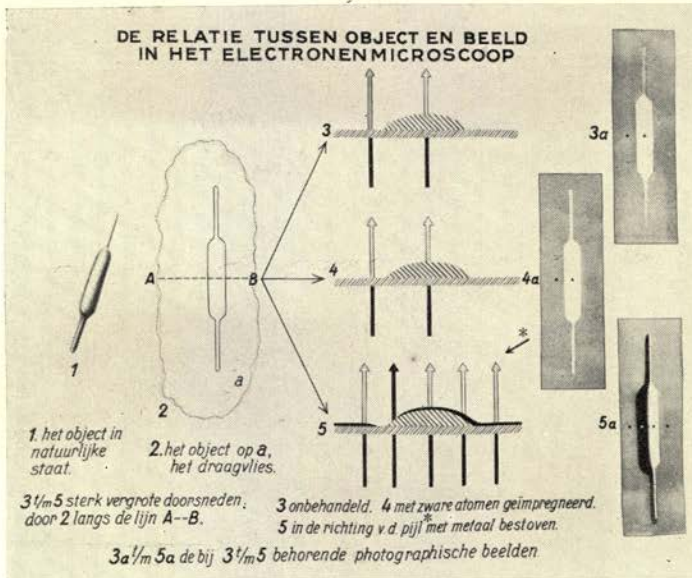


fig. 1. Voor verklaring zie de tekst



fig. 2. Het Philips electronenmicroscop voor 100 kV. Het eigenlijke microscop is de hellende buis, die aan de voorzijde trechtervormig wijder wordt en daar is afgesloten door het fluorescentiescherm. Voor het maken van fotografische opnamen kan een 35 mm camera zonder onderbreking van het vacuüm in de stralengang geschoven worden. De kast bevat de uitgebreide elektrische hulpapparatuur en de vacuumpomp.
(Opname welwillend afgeestaan door N.V. Philips' Gloeilampenfabrieken te Eindhoven)



fig. 3. Spirillum, een bacterie met zweepdraden. Ge., „schaduw“ met een legering van goud en palladium. De oneffenheden in het oppervlak van het bacterie-lichaam verraden plaatselijke verschillen in watergehalte vóór het uitdrogen. (Opname welwillend afgestaan door N.V. Philips' Gloeilampenfabrieken te Eindhoven)

de bovenstaande korte bespreking van de grondbeginselen genoeg. Langer moeten wij stilstaan bij een op het eerste gezicht futiel detail: de veranderingen, die wij ons object gewild of ongewild doen ondergaan vóór de electronenmicroscop-opname tot stand komt.

In de eerste plaats: electronen zijn slechts bruikbaar voor ons doel als zij op hun baan niet telkens tegen luchtmoleculen botsen: het gehele electronenmicroscop, van electronenbron tot fotografische plaat, is tijdens de opname zo goed mogelijk luchtledig. Wat wil dat voor ons biologische object zeggen? Een diepgaande verandering in vorm en structuur, daar immers zo goed als al het water zal verdampen. En welk belangrijk bestanddeel van de levende weefsels is het water niet!

Ten tweede: electronen verschillen in doordringingsvermogen wel heel sterk van de uit onze praktijk bekende Röntgenstralen. Zo zeer, dat slechts zéér dunne objecten in voldoende mate door electronen worden doorstraald. Bovendien wordt de strooiing van het dunne vliesje, dat het object in het electronenmicroscop ondersteunt, op die van het object gesuperponeerd met nadelig gevolg voor het contrast in de opname. Hierdoor gaan mogelijke details in het inwendige van de objecten verloren, terwijl uiterst dunne en zwak strooiende gedeelten van het object niet eens worden waargenomen.

Geen wonder dat men zon op hulptechnieken, die het onderzoek met het electronenmicroscop vruchtbaarder zouden kunnen maken.

In het schema van fig. 1 zijn enkele van die technieken samengevat. Geheel links is het object in zijn natuurlijke staat afgebeeld (1). Het is een fantasie-object van de grootte-orde van een bacterie. Datzelfde object wordt in 2 van boven gezien. Het ligt op het draagvliesje a en is gereed voor de opname. Geheel rechts ziet U een drietal „opnamen” van dit object (3a, 4a en 5a). Waar iedere aanduiding van de werkelijke vergroting binnen het raam van een tijdschriftbladzij uitgesloten is, hebben wij in dit schema de opnamen even groot weergegeven als het object. In 3, 4 en 5 is een drietal doorsneden door object en draagvlies (langs de lijn A—B in 2) getekend. Het valt op, dat van de rolronde doorsnede van het object in natuurlijke staat niets meer over is: hiermee wordt in dit schema de invloed van de wateronttrekking weergegeven. In 3 wordt een object voorgesteld, dat op de uitdroging na geen behandeling heeft ondergaan. De verticale pijlen geven delen van de in werkelijkheid natuurlijk homogeen bundel electronen weer. Door de tint van de pijlen wordt van de beschouwde delen van de electronenbundel de intensiteit weergegeven. Een lichtsterke bundel geeft een uitgesproken zwarting van de fotografische plaat en is derhalve in het schema zwart getekend weergegeven. Geringere intensiteiten worden door verschillende tinten grijs voorgesteld. In het geval van 3 zou dus de electronenbundel bij afwezigheid van het object de plaat geheel zwart maken. Door de strooiing van electronen in draagvlies alleen (linkerpijl) en in draagvlies plus object (rechterpijl) neemt het zwartingsvermogen van de electronenbundels af. In 3a ziet men de resulterende opname. In deze figuur wordt de plaats van de pijlen

door de zwarte stippen aangegeven. De tint van de opname om deze stippen correspondeert met die van de pijlen. In het geval van ons hypothetische object is het contrast, dat in het dikke middengedeelte voldoende is, te gering voor duidelijke weergave van de dunnere uitsteeksels.

In 4 en 4a worden de verhoudingen weergegeven voor het geval van hetzelfde object, dat nu echter met zware atomen geïmpregneerd is. (Men legt het object hiertoe enige tijd in een oplossing van een zout van een zwaar metaal, bijvoorbeeld van wolfram). De zware metaal-atomen verstrooien zeer sterk de electronen zodat het verschil in intensiteit tussen de door het draagvlies alleen en de door het draagvlies en het object doorgelaten delen van de electronenbundel groot wordt. Het contrast neemt toe en zelfs de dunne delen van het object worden duidelijk afgebeeld.

Op geheel andere wijze wordt het contrast verhoogd bij de methode, die door 5 en 5a wordt verduidelijkt. Draagvlies en object zijn als in 3, doch zij hebben vóór het onderzoek in het electronen-microscop een bijzondere behandeling ondergaan. Hiertoe werd het draagvlies met het object horizontaal in een geëvacueerde ruimte gelegd: In dezelfde ruimte bevond zich opzij en iets boven het vlak van het praeparaat een gloeidraad. Deze gloeidraad werd door een elektrische stroom zo sterk verhit, dat het metaal verstoof. De metaal-atomen bewegen zich onder deze omstandigheden langs rechte banen en hechten zich vast aan elk obstakel dat zij op hun weg vinden. Ook het object werd aldus bestoven. Doch de metaal-atomen troffen het object onder een zeer schuine hoek (zie het pijltje met de * in 5) en hechtten zich op oneffenheden op dezelfde wijze als sneeuwvlokken in een sneeuwjacht aan de windzijde van heggen en dijken. Van het beeld, dat het electronenmicroscop van een op deze wijze voorbehandeld object levert, kan men zich als in de voorgaande gevallen met behulp van de pijlen een voorstelling maken. De laag metaal-atomen verstrooit de electronenstraal zoveel sterker dan draagvlies en object dat veel grotere intensiteiten nodig zijn voor het bereiken van de weergegeven contrasten. Daarom is de verticale pijl, die gaat door de zone van object en draagvlies, welke door de schaduwwerking vrij bleef van metaal-atomen, ook boven het object geheel zwart getekend. Immers hij zwart de plaat geheel en levert de slagschaduw van 5a. Aan deze schaduwen, die de opname het uiterlijk van een maanfoto verlenen, dankt het beschreven procédé de naam van „shadowcasting”.

Uit het schema is duidelijk, dat de ware uitbreiding van een object uit deze beelden niet met zekerheid is af te leiden, daar immers een deel in de „schaduw” ligt. Wel kan men bij bekende bestuivingshoek uit de lengte van de schaduw de hoogte van het object boven het vlak van het draagvlies berekenen.

Fig. 3 geeft een werkelijke opname van een micro-organisme met contrastverhoging door „shadow-casting”.

Het beeld van een geschaduwd praeparaat is uitsluitend afhankelijk van de dikteverhoudingen van de laag metaal-atomen. Deze verhou-

dingen zijn behalve van de bestuivingsmethode afhankelijk van de *vorm* van het object (in vacuo!). Voor zover de aard van ons object zich niet in zijn *vorm* uit zal die aard zich dus in een „geschaduwde” opname niet kunnen verraden. (In dit opzicht staat de methode ten achter bij die van 3 en 4 uit het schema, daar in die gevallen althans plaatselijke verschillen in dichtheid of in affiniteit voor metaalzouten in de opname zullen kunnen worden weergegeven).

Is deze beperking tot de uitwendige vorm van het object reeds hier duidelijk, nog meer treedt deze bijzonderheid naar voren in de techniek van het onderzoek van *afdrukken*. Hiertoe maakt men collodium- of plastic-afdrukken van natuurlijke of kunstmatige oppervlakken. Deze afdrukken worden nogmaals afgedrukt en de dus verkregen positieven na „shadow-casting” aan het onderzoek met het electronen-microscop onderworpen. Ook laat men wel de vervaardiging van een positief na om meteen het negatief te schaduwen. Deze variant is vooral gewenst als men korreltjes of vezeltjes van het object, die aan de afdruk kunnen blijven hangen, wil onderzoeken. Op deze wijze lukt het bijvoorbeeld door het afdrukken van een geëst dentine-oppervlak niet alleen een beeld te krijgen van het reliëf van dit oppervlak, doch ook van de vorm van met de afdruk uit de dentine losgetrokken fragmenten van collageene fibrillen (zie hiervoor het artikel van Scott en Wyckoff in J. Dent. Res. 29, 536 (1950)).

Samenvattende kunnen wij vaststellen, dat het electronenmicroscop ons de zo zeer gewenste vergroting van het oplossende vermogen heeft gebracht: wij kunnen inderdaad veel kleinere objecten waarheidsgetrouw afbeelden dan met het lichtmicroscop mogelijk is. De afmetingen van de kleinste nog juist waarneembare objecten naderen die van de zeer grote moleculen, voorwaar een prachtig resultaat. Doch voor ons, biologen, is de prijs hoog: wateronttrekking, d.w.z. destructie van ons object, is *conditio sine qua non* voor het gebruik van dit hulpmiddel. Bovendien levert ons het electronen-microscop van het gedeutereerde object in vele gevallen slechts de vorm kennen, in het gunstigste geval komen wij iets over grotere of geringere dichtheid voor electronen of over grotere of kleinere affiniteit voor metaalzouten te weten. Deze gegevens zijn waardevol, doch zij kunnen *slechts* gecombineerd met gegevens van andere herkomst leiden tot een begripen van ons object. Op zichzelf beschouwd blijven zij even steriel als de resultaten van puur beschrijvend onderzoek met het lichtmicroscop. Het zien van fijnere details alléén leidt niet tot een dieper doorzien van de natuur.