

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein kommerzielles NFOM so weit umgerüstet, daß Messungen im UV-Bereich bis 300nm und Fluoreszenzmessungen im sichtbaren Bereich ermöglicht wurden. Die Zählraten waren in der Regel hoch genug, um Messungen unterhalb eines 5%-igen Rauschens im sichtbaren- und im UV-Bereich durchzuführen. Die Ergebnisse demonstrierten eine Detektionsempfindlichkeit des Systems, die es ermöglicht, bei niedrigen Anregungsleistungen von ca. 10nW und Sondenaperturen von ca.100nm im Durchmesser noch 5500 fluoreszierende Moleküle detektieren zu können. Die grundsätzlichen Voraussetzungen für Untersuchungen zur Penetration von lichtabsorbierenden und fluoreszierenden Substanzen in Haut und Haaren sind damit erfüllt worden.

Es konnten UV-Filter anhand ihrer Absorption im UV-Bereich mit dem NFOM auf Glasträgern und in Epondünnschnitten abgebildet werden. Durch den Vergleich zweier Messungen mit verschiedenen Wellenlängen war es möglich, UV-Absorber aufgrund der verringerten Transmission bei einer der beiden Wellenlängen eindeutig zu lokalisieren. Die Anzahl der notwendigen Moleküle, die zu einer 5%-igen Transmissionsverringering beitragen müssen, wurde zu 170000 abgeschätzt.

Die Dünnschnitte von Haut zeigten eine Mischung aus optischen Eigenschaften und Topographie bei allen zur Verfügung stehenden Wellenlängen. Dies führte zu einer Darstellung wesentlicher Strukturen der Haut im optischen Transmissionsbild. Die eindeutige Trennung von der reinen Absorption und allen anderen kontrastgebenden Eigenschaften der Probe (Schichtdicken, Streuung, Oberflächenprofil) ist durch zwei nacheinander durchgeführten Messungen mit unterschiedlichen Wellenlängen nicht möglich. Zudem stellte sich heraus, daß bei den zur Verfügung stehenden Sonden die Sensitivität nicht hoch genug ist, um einen ausreichenden Kontrast zu erzielen. Eine Penetration von mehr als 10% des UV-Filters in die Epidermis könnte einen ausreichenden Kontrast herbeiführen, jedoch sind nach anderen Untersuchungsmethoden nicht mehr als 5% des UV-Filters zu erwarten. Aus diesen Gründen ist eine Untersuchung zur Penetration von Substanzen an Dünnschnitten mit dem NFOM im Transmissionsmodus nicht sinnvoll.

Eine Darstellung von Hautstrukturen mit Hilfe der Immunmarkierung konnte in den Fluoreszenzmessungen mit dem NFOM durchgeführt werden. Die Fluoreszenzbilder waren mit den klassischen Lichtmikroskopieaufnahmen vergleichbar und zeigten mit lateralen Auflösungen um 130nm die Verteilung des Cytokeratin10 in der Epidermis. Damit eröffnet sich grundsätzlich eine Alternative für eine hochauflösende Lokalisation von Substanzen im Hautinneren, falls sich die zu untersuchende Substanz durch Antikörper markieren läßt.

Anhand einer Penetrationsstudie eines Fluoresceinderivates an Humanhaaren konnte ebenfalls das Potential der NFOM demonstriert werden. Die Verteilung im Haarinneren des fluoreszierenden Fluorochrome zeigte bevorzugte Penetrationswege von Fluorophoren in das Haarinnere aus nicht-wäßrigen Lösungen. Der direkte Vergleich von NFOM und CLSM bestätigte, daß Fluoreszenzmessungen mit dem NFOM einen nahezu identischen Kontrast wie die klassische Lichtmikroskopie liefern. Die Auflösungen lagen auch hier bei ca. 130nm im NFOM. Die genaue Lokalisation von Farbstoffen oder von fluoreszenzmarkierten Substanzen im Haarinneren kann Rückschlüsse auf die Wirkungsweise der angewendeten Produkte in der kosmetischen Industrie geben.

Letztlich sind in der reinen Transmissionsmessung zu viele Faktoren für die Kontrastbildung maßgebend, so daß die Lokalisation anhand der Absorption von absorbierenden Substanzen bei stark strukturierten Oberflächen nicht eindeutig durchgeführt werden kann. Im Fluoreszenzmodus kann die NFOM dagegen aufgrund der hohen lateralen Auflösung neue Erkenntnisse hinsichtlich der Penetration von fluoreszierenden Substanzen liefern.

8 Summary

In this work a commercially available scanning near-field optical microscope was modified, in order to operate at 300nm and to perform fluorescence measurements in the visible wavelength range. The noise of the images was below 5% due to a sufficient counting rate in the UV and visible wavelength range. Furthermore, the results have demonstrated that 5500 fluorescent molecules could be detected with an exciting light power of 10nW. Therefore the basic prerequisites are achieved to investigate a penetration of UV-absorbers and fluorescent molecules into skin and hairs.

UV-absorbers have been localized on a glass-slide and in epon thin cross-sections, because of their absorbance in the UV-light range. The comparison of two optical images with different wavelength enabled a clear localisation of the UV-absorber by its absorption properties at a defined wavelength. The amount of absorbing molecules, which are required for a 5% signal reduction, was estimated to be 170000.

The images of ultra thin cross-sections of human skin have shown a mixture of optical properties and topographical influences at all available wavelengths. This leads to an image of morphological structures of skin in transmission mode. The separation of absorbance from all kind of other properties influencing the optical contrast (thickness, scattering, surface profile) is not possible by measuring with two different wavelengths. Additionally it was found that the sensitivity for a sufficient contrast generation due to absorbance of the UV-absorbers is not high enough using the available probes. A penetration of more than 10% of the applied UV-absorber is required to give a chance of a localisation in the epidermis.

It was possible to represent immuno labeled structures of skin operating in fluorescence mode. The NFOM images were comparable with classical light microscopy and have shown the distribution of cytokeratin10 with a lateral resolution of about 130nm. This gives an alternative for a localisation of substances in skin with high resolutions, if it is possible to label the substance by an antigene.

Another penetration study of fluorescent molecules into human hairs has also demonstrated the high potential of NFOM in fluorescence mode. The distribution of a fluorescein derivate has shown preferred penetration pathways into human hairs in non aqueous solutions. The direct comparison of CLSM and NFOM images confirms the statement, that the contrast is nearly identical to classical light microscopy. The exact distribution of fluorophors or fluorescent labeled substances may help to understand the principle interactions of applied cosmetic products in the future.

Finally the contrast mechanism in transmission mode of the NFOM is dependent on many factors, which do not allow a clear localisation of absorbing substances in structured sample surfaces. In fluorescence mode the NFOM offers an alternative to classical light microscopy, which can provide new knowledge with regard to a penetration of fluorescent substances due to the higher lateral resolution.