

In Vitro-Hydratationsdynamik der
menschlichen Hautbarriere:
Eine Tieftemperatur-REM und TEM
Studie von Wassereffekten im
Stratum Corneum

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Physik
der Universität Hamburg

vorgelegt von
TOBIAS RICHTER
aus Bremerhaven

Hamburg
2004

Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. Roland Wiesendanger
Prof. Dr. Klaus-Peter Wittern

Gutachter der Disputation:
Prof. Dr. Roland Wiesendanger
Dr. Roger Wepf

Datum der Disputation:
14. Juni 2004

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:
Dr. Hans Dierk Rüter

Vorsitzender des Promotionsausschusses:
Prof. Dr. Roland Wiesendanger

Dekan des Fachbereichs Physik:
Prof. Dr. Günter Huber

Meinen Eltern

Die Weisheit ist die Tochter der Erfahrung.
LEONARDO DA VINCI

Inhaltsangabe

Diese Dissertation untersucht mittels Elektronenmikroskopie das Hydratationsverhalten des Stratum Corneums. Im ersten Kapitel werden die theoretischen Grundlagen beschrieben, beispielsweise die Bildung des Stratum Corneums und welche Aufgabe es speziell in der Permeationsbarriere der Haut spielt. Die Elektronenmikroskopie ist für die Untersuchung von biologischem Material seit Jahrzehnten etabliert. Eine korrekte Interpretation der Bilder erfordert aber das Wissen um die Wechselwirkung zwischen den Elektronen und der Probe sowie der Signalkontrastmechanismen, die zudem beeinflusst werden durch die genaue Präparation. Daher schließen sich an die biologischen Grundlagen auch solche über die Elektronenmikroskopie an.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine bestehende Probenpräparationstechnik für Haut wesentlich weiterentwickelt: Beispielsweise wurden die Proben nicht chemisch fixiert, sondern physikalisch immobilisiert, damit insbesondere der inhärente Wassergehalt erhalten blieb. Dies geschah beispielsweise durch Gefrieren in flüssigem Ethan (Plungegefrieren), um große Querschnittsflächen und somit statistische Auswertungen des Hydratationsverhaltens nach topischer Applikation verschieden konzentrierter Salzlösungen zu ermöglichen. Hochauflösende Strukturuntersuchungen wurden an hochdruckgefrorenen Proben durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht, welchen Einfluß die Eröffnung eines zusätzlichen Penetrationsweges hatte, indem das Stratum Corneum auch von der Seite hydriert wurde. Durch diese Adaption von Präparation und Abbildung an das spezielle Probenmaterial wurde es nicht nur möglich, einzelne hochauflösende Aufnahmen zu interpretieren, sondern auch die biologische Variation und Signifikanz der Daten zu beurteilen.

Anhand der erhobenen Daten zeigt sich ein lokal unterschiedliches Hydratationsverhalten: Während die Zellen des tiefen und des oberen Stratum Corneum (Hautaußenseite) sehr hydrophil wirken und in ihrer Hydratation und Dicke zum Teil deutlich mit den extern applizierten Medien korrespondierten, konnte sowohl bei Oberarm- als auch bei Gesichtshaut eine mittlere Zone identifiziert werden, die die geringste Wasseraufnahme zeigte und auch mechanisch sehr stabil war. Dies berechtigt zu der Annahme, daß dies der Ort der effektivsten Hydratationsbarriere im Stratum Corneum ist.

Abstract

In this thesis, the hydration-behaviour of the Stratum Corneum is investigated by electron microscopy. The first chapter provides general theoretical background, for example the formation of the Stratum Corneum and its biological function as a permeation barrier in the skin. Although the electron microscopy of biological samples is established as a common technique for decades, proper interpretation of the images requires further knowledge about the underlying electron-sample-interactions and signal contrast mechanisms. These are also affected by the sample preparation. Thus, the chapter about the biological basics is followed by a chapter about electron microscopy.

A part of this work consists of modifying and improving an existing sample preparation protocol for skin: Instead of chemical fixation, the samples were physically fixed to reliably preserve the inherent water content. For example, freezing in liquid ethane (plunge freezing) makes large cross sections and statistical analysis of the hydration behaviour after topical application of different salt solutions possible. High resolutional images were possible with high pressure frozen samples. Additional investigations were performed after enabling a further penetration pathway by hydrating the Stratum Corneum from the side. Having adapted the preparation protocol to the specific sample type, it became possible not only to interpret single high resolutional images but also to estimate the biological variation and significance of all data.

The data show a local variation of the hydration behaviour: Cells in the deeper and upper Stratum Corneum (near the outside of the skin) are extremely hydrophilic and their hydration state and thickness in part corresponds directly with the externally applied media. Between these two zones, a zone with very low water uptake and high mechanical stability could be discriminated using samples from the upper arm and from the face. This leads to the hypothesis that the effective hydration barrier of the Stratum Corneum is located in this zone.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Das Stratum Corneum als Teil der humanen Haut	4
2.1.1 Subcutis	4
2.1.2 Dermis	4
2.1.3 Epidermis	7
2.2 Elektronenmikroskopie	10
2.2.1 Wechselwirkungen zwischen Probe und Elektronen	11
2.2.2 Rückgestreute und emittierte Elektronen	14
2.2.3 Rasterelektronenmikroskopie	16
2.2.4 Transmittierte Elektronen	21
2.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie	21
2.2.6 Streuabsorptionskontrast	22
2.2.7 Phasenkontrast	24
2.3 Präparation von biologischen Proben für die Elektronenmikroskopie	25
2.3.1 Theoretische Grundlagen	27
2.3.2 Gefrier-Techniken	30
2.3.3 Cryo-Präparation	33
2.3.4 Gefriersubstitution	38
3 Materialien und Methoden	43
3.1 Probenvorbehandlung und Präparation	43
3.1.1 Das Hautmaterial	43
3.1.2 Hydratationsexperimente	44
3.1.3 Morphologieuntersuchungen an hochdruckgefrorenen Proben	47
3.2 Cryo-Präparation und Mikroskopie	47
3.2.1 Cryoschnitte an Hautproben	48
3.2.2 Transfer und Gefrierätzung	49
3.2.3 Bedampfung	50
3.2.4 Mikroskopie im REM	51

3.2.5	Bildauswahl und -auswertung	52
3.3	Präparation und Mikroskopie gefriersubstituierter Proben	55
3.3.1	Gefriersubstitution	55
3.3.2	Polymer-Dünnschnitte	59
3.3.3	Nachkontrastierung	59
3.3.4	Mikroskopie im TEM	60
4	Resultate	61
4.1	Morphologie der Hautproben	61
4.1.1	Artefakte	62
4.1.2	Morphologie des Stratum Corneums	65
4.1.3	Morphologie der Epidermis und Dermis	68
4.2	Darstellung weiterer Hautstrukturen	71
4.2.1	Haar	71
4.2.2	Fettzellen	72
4.2.3	Kollagen	72
4.2.4	Oberflächenstruktur von Corneozyten	77
4.3	Morphologie des Stratum Corneums bei definierter Hydratation	77
4.3.1	Allgemeine Morphologie	77
4.3.2	Morphologieveränderungen im Hauptexperiment	81
4.3.3	Morphologieveränderungen im Kontrollexperiment	85
4.3.4	Zeitaufgelöste Morphologieuntersuchungen mit Glycerin	86
5	Diskussion	91
5.1	Diskussion der experimentellen Methoden	91
5.1.1	Cryo-Ultramikrotomie und Cryo-Präparation	92
5.1.2	Gefriersubstitution	93
5.1.3	Ultrastrukturdarstellung im REM und TEM	94
5.2	Quellverhalten und Stabilität im Stratum Corneum	96
5.2.1	Morphologieveränderungen	96
5.2.2	Unterschiedliche Zonen im Stratum Corneum	97
5.2.3	Glycerinexperiment	102
5.2.4	Vergleich mit <i>In vivo</i> - Daten	103
5.2.5	Vergleich mit anderen EM-Untersuchungen zum Hydratationsverhalten	105
5.3	Stratum Corneum-Integrität	109
5.4	Klinische Bedeutung der Hydratationsergebnisse	110
6	Ausblick	111
6.1	Präparation	111
6.2	Mikroskopie und Auswertung	112
7	Zusammenfassung	113

A	Abbildungsverzeichnis	117
B	Tabellenverzeichnis	119
C	Publikationen und Präsentationen	121
D	Literaturverzeichnis	125

Kapitel 1

Einleitung

Als das Leben vor Urzeiten das Meer verließ, um das Land zu erobern, mußte sich nicht nur das Atmungssystem von Kiemen auf Lungen umstellen. Mindestens genauso entscheidend war die Ausbildung einer effektiven Hydratationsbarriere an der Körperaußenseite, um unkontrollierten Wasserverlust und damit ein Austrocknen des Organismus zu vermeiden. Mit der Haut hat sich während der Evolution eine solche Barriere entwickelt, die das Körperinnere auch gleichzeitig vor Mikroorganismen, chemischen, osmotischen, thermischen und mechanischen Einwirkungen schützt. Letzteres zeigt sich insbesondere an mechanisch belasteten Hautarealen (wie zum Beispiel an der Fußsohle und den Innenseiten der Hände), wo die Haut besonders dick ausgebildet ist. Bei sehr starker Belastung kommt es gar zur Schwielenbildung. Selbstverständlich ist auch der "moderne" Mensch nach wie vor von einem einwandfreien Funktionieren seiner Haut abhängig. Das wird einem drastisch vor Augen geführt, wenn große Hautareale zerstört sind (beispielsweise durch starke Verbrennungen) und dadurch akute Lebensgefahr besteht.

Wenn bisher von der Wirkung der Haut als Barriere die Rede war, so ist dies nicht statisch zu verstehen, denn neben ihrer Schutzfunktion dient die Haut als Speicher für Fette, Zucker, Wasser und Salze [1] und als Stoffwechselorgan; als Beispiel sei hier die Synthese von Vitamin D mit Hilfe von Sonnenlicht erwähnt. Darüber hinaus ist die Haut auch ein wichtiges Sinnesorgan, indem sie Schmerzen, Wärme und Druck registriert und verarbeitet, und sie besitzt eine gewisse Bedeutung als Atmungsorgan. Weitere Einblicke in Funktion und Aufbau der Haut gibt [2], [3], [4].

Möglich gemacht werden diese vielfältigen Funktionen der Haut unter anderem durch die komplexe Organisation: Während ihre Speicher- und Stoffwechselfunktion ausschließlich von den lebenden Schichten ausgeübt wird, ist der äußere tote Bereich, das Stratum Corneum, hauptsächlich für die Barrierefunktion zuständig. Es besteht aus flachen*, parallel angeordneten Zellen, den Corneozyten, und dazwischenliegenden Lipiden, die auch parallel organisiert sind und Lamellen bilden. Es ist bekannt, daß Hautkontakt mit Lösungsmitteln (zum Beispiel Aceton) den Zusammenhalt im Stratum Corneum massiv stört [5]. Auch Kontakt mit destilliertem Wasser für mehrere Minuten zerstört deutlich die mechanische

* typische Dicken: 200 nm, typische Durchmesser: 30 µm.

Integrität und es kommt zur Ausbildung von Wasseransammlungen zwischen den Corneozyten, die auch ihrerseits eine massive Wasseraufnahme zeigen [6],[7]. Insbesondere die Reaktion dieser Schichten, die den Körper vor Dehydratation schützen sollen, auf eine extern aufgeprägte Befeuchtung ist bisher noch nicht systematisch untersucht worden.

Die nötige Auflösung für eine solche Untersuchung bietet beispielsweise die Elektronenmikroskopie. Sie hat sich in den letzten Jahrzehnten als unverzichtbar bei der Strukturanalyse von biologischen Systemen erwiesen, was nicht zuletzt an der hohen Auflösung und in dem breiten Anwendungsspektrum begründet liegt. Weil aber für die Untersuchungen sämtliche Stoffwechselprozesse in den Proben nachhaltig gestoppt werden müssen und weil der intrinsische Wassergehalt im Inneren die Abbildung mittels eines Elektronenstrahls unmöglich machen würde, haben sich verschiedene Präparationsverfahren entwickelt. Sie sind speziell den jeweiligen Proben angepaßt und besitzen spezifische Vor- und Nachteile. Insbesondere Artefakten und strukturellen Beeinflussungen kommt dabei entscheidende Bedeutung zu, sodaß die Qualität und die Aussagekraft der elektronenmikroskopischen Untersuchungen meist ganz wesentlich durch die Präparation bestimmt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit werden Hydratationsstudien an humaner Haut vorgenommen, indem verschieden konzentrierte Salzlösungen für 12 Stunden extern appliziert werden. Für die Untersuchung ist bereits eine entsprechende Präparation etabliert [8], die die Visualisierung im Elektronenmikroskop erlaubt. Diese muß allerdings dem Untersuchungsgegenstand und den speziellen Anforderungen angepasst werden. Beispielsweise ist für eine statistische Analyse der Veränderung einzelner Corneozyten nach Hydratation das Anfertigen großer Querschnitte der Haut notwendig. Ferner darf der Wassergehalt im Gewebe nicht verändert werden und schließlich sollen neben statistischen Analysen auch hochauflösende Abbildungen des Stratum Corneums ermöglicht werden.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

Untersuchungsgegenstand dieser Dissertation ist die Morphologie des Stratum Corneums und dessen Veränderung bei definierter Hydratation. Es ist Teil der Haut, die bei allen Landlebewesen ein hochspezialisiertes Organ mit spezifischen Funktionen darstellt, die in engem Zusammenhang mit dem histologischen Aufbau steht. In Abschnitt 2.1 ab Seite 4 wird daher das Stratum Corneum als Teil der nächstgrößeren Struktur, der Epidermis, beschrieben. Besonderes Gewicht wird dabei neben der Histologie und Physiologie insbesondere den Aspekten der mechanischen Stabilität zukommen.

Das Stratum Corneum ist aus einzelnen Zellen, den *Corneozyten*, aufgebaut. Typischerweise haben sie Dicken von wenigen 100 nm und sind damit lichtmikroskopisch praktisch nicht in ihrer biologischen Dynamik statistisch zu analysieren. Die Elektronenmikroskopie, die sich in den letzten Jahrzehnten in der biologischen Forschung als unverzichtbar herausgestellt hat, ist da wesentlich geeigneter. Allerdings erhält man so kein direkt sichtbares Abbild, sondern generiert dieses erst aus den detektierten Elektronen, die mit der Probe interagiert haben. Abschnitt 2.2 ab Seite 10 beleuchtet die zugrundeliegenden Wechselwirkungen, die verschiedenen Mikroskopieverfahren sowie die Detektionsmechanismen für Elektronen als für die Interpretation der Bilder unverzichtbare Grundlagen.

Um eine ungestörte Flugbahn der Elektronen zu gewährleisten, herrscht im Inneren von Elektronenmikroskopen Vakuum*. Das Stratum Corneum – wie alle biologischen Strukturen – besitzt allerdings einen intrinsischen Wassergehalt, der im Vakuum kontinuierlich evaporieren würde, was eine stabile reproduzierbare Abbildung unmöglich machen würde. Um nun die Eigenschaften des Stratum Corneums mit den Anforderungen der Elektronenmikroskope in Einklang zu bringen, sind spezielle Probenpräparationen notwendig, auf die in Abschnitt 2.3 ab Seite 25 eingegangen wird.

* Es gibt auch Elektronenmikroskope, die bereits bei Raumtemperatur und einem Vakuum von 2500 Pa bis 7000 Pa betrieben werden können, sodaß Wasser nicht aus der Probe evaporiert. Allerdings sind bei Raumtemperatur keine Querschnitte von Haut in einer für diese Arbeit notwendigen Präzision herzustellen und abzubilden.

2.1 Das Stratum Corneum als Teil der humanen Haut

Die Haut ist mit ca. $1,8\text{m}^2$ eines der flächenmäßig größten und mit der Lunge zusammen eines der wenigen Organe, das zwischen zwei unterschiedlichen Kompartimenten liegt: Auf der einen Seite findet sich das Innere des menschlichen Körpers, ein Medium im wohldefinierten und stets sorgfältig aufrechterhaltenen Gleichgewichtszustand, das sich unter anderem durch konstante Feuchtigkeit, Temperatur und Salzkonzentration sowie festen pH-Wert auszeichnet. Auf der Außenseite hingegen befindet sich die Umwelt des Menschen, das heißt eine Umgebung, die sich äußerst vielgestaltig präsentiert. Den größten Teil des Körpers bedeckt die Felderhaut, die durch linienförmige Vertiefungen in kleine Felder unterteilt und unterschiedlich behaart ist. Bei der Leistenhaut hingegen fehlen Haare und Talgdrüsen; sie findet sich beispielsweise an den Innenflächen von Händen und Füßen. Morphologisch gliedert sich die Haut im wesentlichen in drei Teile (vergleiche Abbildung 2.1 auf der folgenden Seite): Die *Subcutis*, die *Dermis* und schließlich die *Epidermis* auf der Körperaußenseite; letztere werden in eigenen Kapiteln (2.1.2 und 2.1.3) beschrieben.

2.1.1 Subcutis

Die Subcutis (auch Unterhaut genannt) ist eine von der Dermis nicht scharf abgegrenzte lockere Bindegewebsschicht mit stellenweise umfangreichen Fetteinlagerungen (dem Unterhautfettgewebe) das die Auspolsterung der Haut übernimmt und als schlechter thermischer Leiter vor Wärmeverlust schützt. Die Verschiebbarkeit der Haut ist in dieser Schicht begründet [9]. In der Unterhaut liegen zahlreiche Blutgefäße, die ihre Ausläufer in immer feineren Verästelungen bis in die Papillen der Dermis aufsteigen lassen. Außerdem beinhaltet diese Schicht ein dichtes Netz von vegetativen Nerven, die an den Drüsen, Muskeln und Blutgefäßen der Haut enden. Zudem sind Subcutis und Dermis dicht von sensiblen Nervenfasern durchsetzt, die nach vielen Verästelungen entweder als freie Nervenenden (Schmerzsinn) auslaufen oder Nervenendorgane bilden. Diese Nervenendorgane vermitteln die verschiedenen Hautsinnesempfindungen wie Druck, Wärme, Kälte und den Ortssinn. Sie liegen so dicht vermischt nebeneinander in der Haut, daß immer gleichzeitig verschiedene Reizeindrücke zusammen vermittelt werden. So fühlt man zum Beispiel zur gleichen Zeit, ob ein Körper spitz, hart und kalt ist usw. Durch diese Reizaufnahme können als Abwehrmaßnahme des Körpers Reflexvorgänge eingeleitet werden.

2.1.2 Dermis

Die Dermis ragt in die Epidermis mit vielen kegelförmigen Vorsprüngen, den Papillen, hinein. Sie enthalten feine Blutgefäße (Kapillaren), die die Ernährung der gefäßlosen Epidermis gewährleisten. An den Innenflächen der Hände und Füße, besonders an den Fingerbeeren, sind hohe und weniger hohe Papillen in parallelen Linien so angeordnet, daß auf der Hautoberfläche feine Leisten und Rillen entstehen, die bei jedem Menschen (selbst bei eineiigen Zwillingen) verschieden sind und den charakteristischen Fingerabdruck ergeben. Die Dermis hält die Haut unter dauernder elastischer Spannung. Deshalb klaffen ihre

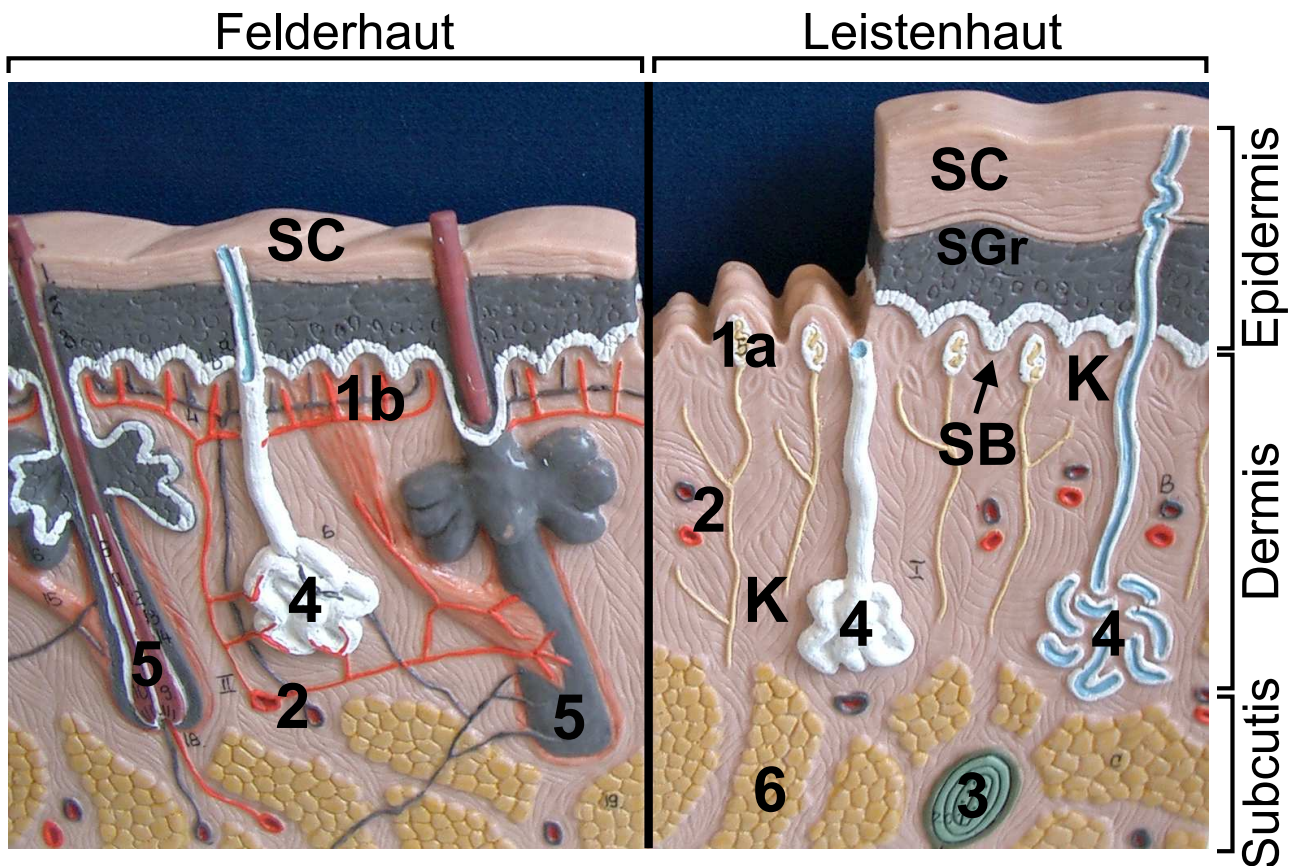


Abbildung 2.1: Schematischer Querschnitt durch Felderhaut (links) und Leistenhaut (rechts): Die Dermis ist über zapfenförmige Vorsprünge, den Papillen, mit der Epidermis verbunden. Diese Papillen tragen Nervenenden (1a: MEISSNERSches Tastkörperchen) und sorgen für die Ernährung der gefäßlosen Oberhaut (1b zeigt Kapillarschlingen der Papillen). Die Epidermis besteht aus dem Stratum Basale (SB), dem Stratum Spinosum (nicht eingezeichnet), dem Stratum Granulosum (SGr) und findet ihren Abschluß im Stratum Corneum (SC). 2: quer angeschnittene Blutgefäße; 3: Nervenende (VATER-PACINISCHES Lamellenkörperchen); 4: Schweißdrüse; 5: Haarwurzel (Haare fehlen in der Leistenhaut); 6: Fettzellen; K: Bereich des Kollagens in der Dermis .

Ränder auseinander, wenn man sie einschneidet.

Die Dermis besteht aus einem Geflecht von Bindegewebe und elastischen Fasern. Eine wesentliche Bedeutung kommt dabei den Kollagenfasern zu (auf das 98 % des Trockengewichtes der Dermis entfällt [2]). Weil sie in dieser Arbeit insbesondere zur Beurteilung der Abbildungsqualität der Elektronenmikroscopie genutzt wurden, werden sie in einem gesonderten Unterabschnitt im Anschluß besprochen. Aus tierischen Häuten wird durch Gerbung daraus Leder, woher ihr veralteter deutscher Name "Corium" (Lederhaut) stammt. Sie enthält viele Blut- und Lymphgefäße, Nerven und glatte Muskulatur. Durch die Anordnung und den verschiedenen Verlauf der Bindegewebsfasern entsteht die auf der Oberhaut

sichtbare feine Felderung und die Spaltrichtung der Haut. Durch die Schweißdrüsen kann ggf. aus der Haut Schweiß abgesondert werden, der durch Verdunstung die Haut kühlt und vor Überhitzung schützt.

In der Dermis liegen auch die Wurzeln der Haare. Morphologisch setzen sie sich aus dem inneren Bereich (dem Mark, oder "Cortex") und einem äußeren Bereich (der Cuticula) zusammen, in dem flache, dehydrierte Zellen dachziegelartig übereinanderliegen.

Kollagen

Grundbaustein des Kollagens ist eine Polypeptidkette, die eine α -Helix bildet. Ein Kollagenmolekül besteht aus drei solcher Peptidketten, die sich (vergleichbar mit den beiden Strängen der DNA) rechtsgängig umeinander winden und so eine durch Wasserstoffbrücken stabilisierte Tripel-Alpha-Helix bilden, die gemeinsames Strukturdetail aller Körperkollagene ist. 90% bestehen dabei aus Kollagen vom Typ I, das (zusammen mit Kollagen vom Typ III) in der Haut eine wesentliche Rolle spielt. Die Einzelmoleküle sind 300 nm lang und haben einen Durchmesser von 1,5 nm. Sie lagern sich um 67 nm versetzt zueinander zu Fibrillen zusammen (vergleiche [10], [11] sowie Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3 auf der folgenden Seite). Dies bewirkt eine charakteristische transverse Bänderung der Periode

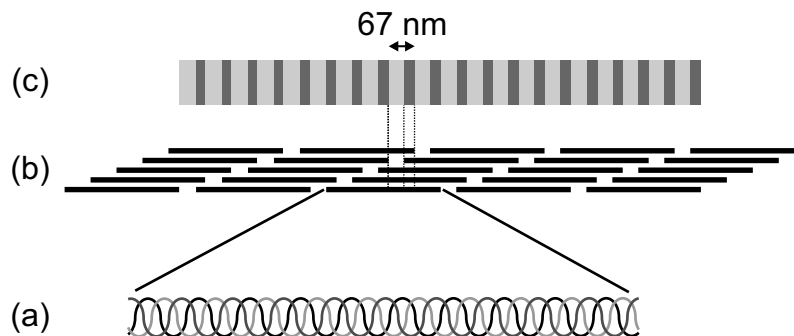


Abbildung 2.2: Aufbau des Kollagen I: Drei α -Polypeptidketten bilden zusammen eine Tripel-Alpha-Helix (a), die das Kollagenmolekül darstellt. Um 67 nm versetzt lagern sich diese Moleküle zu den Fibrillen (b) zusammen. Diese Versetzung bewirkt das charakteristische periodische Hell-Dunkel Muster (c) bei Anfarbung.

(Abbildung nach [11])

67 nm in den Typ I Kollagenfibrillen. Ihr Durchmesser liegt zwischen 50 nm und 200 nm bei einer Gesamtlänge von bis zu einigen Mikrometern. Die einzelnen Kollagenmoleküle sind dabei umeinander verwunden [12], [13], [14]: In den Typ-C Fibrillen schließen die Moleküle mit der Längsachse der Fibrille einen Winkel von 17° ein. Sie besitzen einen kleinen, auffällig uniformen Durchmesser und kommen bevorzugt an anatomischen Stellen vor, wo das Bindegewebe großen und wiederholten Deformationen ausgesetzt ist. Bei den Typ-T Fibrillen hingegen beträgt der Winkel nur ungefähr 5° . Sie haben größere und heterogene Durchmesser.

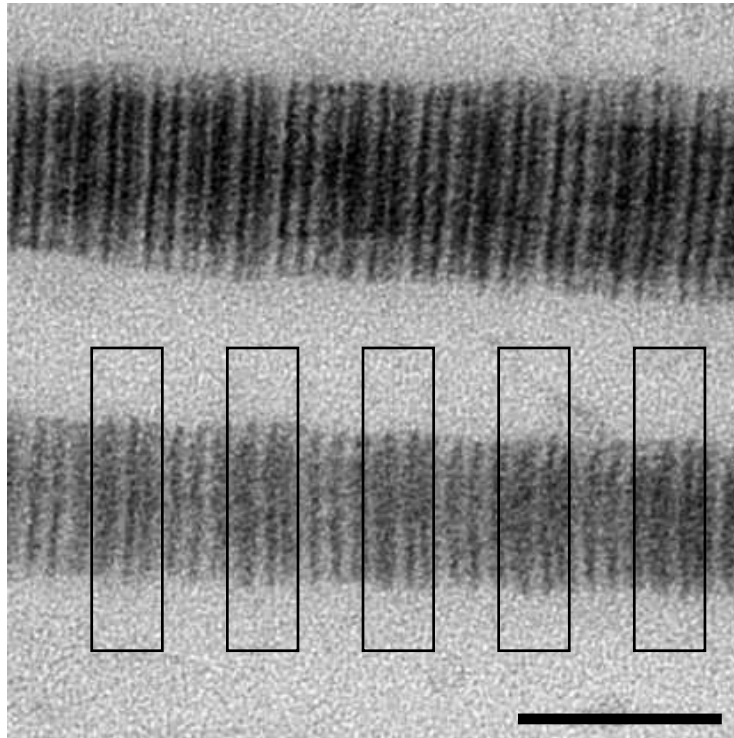


Abbildung 2.3: Unterstruktur der Kollagenfibrillen: TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes einer gefriersubstituierten Probe. Deutlich ist die Bänderung in Längsrichtung zu erkennen. Die 67 nm Periode ist in dieser Auflösung nur noch schwer zu erkennen; sie wurde durch Rechtecke hervorgehoben. Maßbalken: 100 nm (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Roger Wepf)

Die Fibrillen sind zu dickeren Kollagenbündeln angeordnet. Elastische Fasern zwischen diesen Bündeln führen diese nach mechanischer Belastung wieder in ihren Grundzustand zurück. Kollagen hat eine enorme Zugfestigkeit und verbindet daher unter anderem in Sehnen die Muskeln mit den Knochen. Auf das jeweilige Eigengewicht bezogen ist Kollagen (vom Typ I) sogar zugfester als Stahl.

2.1.3 Epidermis

Die Epidermis bildet die äußere Begrenzung des Körpers. Dort werden in der tiefsten Schicht, dem Stratum Basale, kontinuierlich Keratinozyten gebildet, die in einem typischerweise 28 Tage dauernden Zyklus zur Hautoberfläche wandern und dort schließlich durch normale mechanische Belastungen abgerieben werden*. Auf diesem Weg werden sie nacheinander Bestandteile des Stratum Spinosums, des Stratum Granulosums und schließlich des Stratum Corneums, dehydrieren dabei kontinuierlich und durchlaufen verschiedene

* Quantitative Abschätzungen gehen von 2 Milliarden abgeschuppten Zellen täglich aus.

Stoffwechselaktivitäten. Insbesondere werden verschiedene Keratine ([15], [16], [17]) synthetisiert, die eine entscheidende Rolle als Stützproteine spielen. Sie werden ausschließlich in Paaren, bestehend aus einem sauren und einem basischen Polypeptid, exprimiert. Ihre Zusammensetzung ist charakteristisch für den Differenzierungsgrad der Zelle und damit für die jeweilige Epidermisschicht: Für die Basalschicht sind die Paare K5 und K14/K15 typisch, für das Stratum Granulosum hingegen K2e und K11. Circa 90 %-95 % der Epidermiszellen sind Keratinozyten, der Rest besteht aus Langerhanszellen, T-Lymphozyten, Merkelzellen und Melanozyten zur Immunabwehr und Pigmentierung der Haut [18], [3], [4].

Die Epidermis grenzt sich von der Dermis durch die **Basalmembran** ab, die für größere Moleküle eine Diffusionsbarriere darstellt [19], [20]. Da Blut- und Lymphgefäße in der Epidermis fehlen, erfolgt die Ernährung ausschließlich durch Diffusion aus der Dermis; zapfenförmige Vorsprünge (Papillen) erhöhen dabei die Kontaktfläche.

An die Basalmembran schließt sich nach außen das **Stratum Basale** (auch Basalschicht genannt) an, in dessen charakteristisch rechteckigen Zellen sich die basalen Stammzellen finden, die zeitlebens ihre Teilungsfähigkeit behalten. Durch Zellteilung entstehen beispielsweise weitere teilungsfähige Zellen, die in der Basalschicht verbleiben oder Keratinozyten, die weiterdifferenzieren und zur Hautaußenseite wandern. Spezielle Strukturen, die sogenannten *Hemidesmosomen*, verankern die Basalzellen mit der Basalmembran. Durch die Stammzellen bilden sie (ähnlich wie das Rückenmark) ein "zelluläres Gedächtnis" der Haut, was unter anderem zur Folge hat, daß sich UV-Schäden in der Erbsubstanz akkumulieren und nach Jahren oder Jahrzehnten zum Hautkrebs führen können.

Das 5 bis 15 Schichten umfassende **Stratum Spinosum** ist geprägt durch eine intensive Stoffwechselaktivität, in der verschiedene Proteine (insbesondere die verschiedenen Keratine) und Lipide synthetisiert und eingelagert werden. Entsprechend viele Organellen finden sich in den Zellen, die untereinander über viele Desmosomen und Tonofibrillen Kontakt haben. In den obersten Lagen bilden sich als besondere Vesikel die rund 100 nm-300 nm großen *Lamellar bodies* (auch *Odlandbodies*, *Keratinosomen* oder *membran coated granules* genannt) aus.

Die Lamellar bodies werden im **Stratum Granulosum**, das ungefähr 1-3 Zellagen umfaßt, mit lamellaren Membranstrukturen gefüllt und exocytiert, wodurch sich hochgeordnete zusammenhängende Lipidlamellen zwischen den Zellschichten ausbilden. Die Proteine verbleiben hingegen im Inneren und vernetzen sich miteinander unter Enzymeinwirkung. Sind die Keratinozyten im **Stratum Corneum** (auch Hornschicht genannt) angekommen, so werden sie Corneozyten genannt. Synthetisierende Organellen und der Zellkern werden abgebaut, sind also höchstens noch als Reste vorhanden, das heißt die Zellen sind tot. Diese Eigenschaft wird im allgemeinen benutzt, um Keratinozyten des Stratum Granulosums sicher von Corneozyten abzugrenzen. In ihrem Inneren wurden die faserförmigen Proteine (Intermediärfilamente, Keratine) durch Kreuzvernetzung zu einem dichten stabilen Gerüst kondensiert. Dieser Prozeß führt zu deutlich abgeflachten und dehydrierten Zellen (ca. 10 %-35 % Wassergehalt [21], [22], [23], [24]) und gibt den Corneozyten ihre Form und außergewöhnliche Festigkeit. Es verbindet auch angrenzende Corneozyten über besonders feste Zell-Zellkontakte, die Desmosomen, miteinander: Sie bestehen aus zwei ge-

genüberliegenden Desmosomenhälften ("desmosomal plaques") – je eine in jeder Zelle –, die wiederum aufgebaut sind aus Integrinen* [25] und über bestimmte Anheftungsproteine mit dem Zytoskelett (Keratin) verknüpft sind. Im Interzellularraum sind die Integrine miteinander assoziiert [9], [26]. Bei Plattenepithelien wie dem Stratum Corneum ist dies besonders stark ausgeprägt.

Gleichzeitig hat sich in den Corneozyten die sogenannte, circa 15-20 nm dicke, Cornified Envelope an der Innenseite der Zellmembran vollständig ausgebildet, die das Keratingerüst vor chemischen Einflüssen schützt und als semipermeable Membran wirkt [27]. Sie besteht aus verschiedenen vernetzenden Proteinen (hauptsächlich Involucrin, Loricrin, Elafin und Cystatin A [28]). Die Cornified Envelope zusammen mit dem Keratingerüst bilden ein chemisch wie mechanisch außerordentlich stabiles inneres Skelett. Zwischen den einzelnen Schichten des Stratum Corneums haben sich kontinuierliche Lipidlamellen ausgebildet, die zusammen mit den Corneozyten die wichtigste Barriere der Epidermis gegen mechanische, biologische und chemische Einwirkungen sowie insbesondere gegen (De)Hydratation bildet [29],[30], [31], [32], [33]. Gegen "normale" mechanische Beanspruchung zeigt sich die Barriere erstaunlich stabil [34], während eine Störung der interzellulären Lipide (beispielsweise durch Einwirkung von Aceton) sie wesentlich stärker schädigt [35]. Die Verdunstungsrate der Haut (auch transepidermaler Wasserverlust genannt; englisch TEWL=Trans Epidermal Water Loss) liegt zwischen $0,3 \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{h}$ und $5 \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{h}$ [3], [36], [37]. Erst diese hocheffektive Hydratationsbarriere macht ein Überleben möglich und erklärt gleichzeitig die Gefahr, die von großflächigen Verbrennungen durch den Zusammenbruch dieser Barriere ausgeht.

Teilweise wird in der Literatur noch das Stratum Lucidum abgegrenzt, das sich nach außen direkt an das Stratum Granulosum anschließt. Es hebt sich allerdings nur in lichtmikroskopischen Aufnahmen insbesondere bei Leistenhaut ab und es ist nicht klar, ob eine grundlegende morphologische Abgrenzung innerhalb des Stratum Corneum gerechtfertigt ist. Insgesamt umfaßt das Stratum Corneum – je nach Körperareal – 5-25 Schichten [38] und ist zwischen $20 \mu\text{m}$ (Augenlider) und $500 \mu\text{m}$ (Ferse) dick [39]. Eine gute Übersicht über das Stratum Corneum gibt Plewig *et al.* in [40]; als Monographie sei [41] genannt.

Wasserhaushalt / NMF

Der Restwassergehalt wie auch der transepidermale Wasserverlust (TEWL) des Stratum Corneums wird unter anderem geregelt über den Gehalt an wasserlöslichen Molekülen, die mit den Corneozyten assoziiert sind [42]. Sie werden zusammenfassend als Natural Moisturizing Factors (NMF) bezeichnet. Dazu zählen beispielsweise Aminosäuren wie Glycin, Prolin, Alanin, aber auch Urea (Harnstoff), Milchsäure, Polyole (beispielsweise Saccharide und Glycerol) und auch alle Salze. Daher werden Hautcremes gezielt NMFs – beispielsweise Glycerin, Urea und auch Honig – zugesetzt, um die Haut zu befeuchten.

* Transmembranproteine der Zellmembran

Zellverklammerungen

Während Desmosomen punktförmig wirken und relativ gleichmäßig verteilt sind (sozusagen wie Niete im Stratum Corneum), bilden benachbarte Corneozyten Überlappungen aus (vergleiche Abbildung 2.4), die typischerweise 10% ihrer Oberfläche ausmachen. Sie sind vielfach wie Klammern oder Anker ausgebildet und scheinen einen bedeutenden Beitrag für die mechanische Stabilität zu leisten; trotzdem sind diese Strukturen noch nicht systematisch untersucht. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit ihr Verhalten bei mechanischer Beanspruchung untersucht werden (Abschnitt 4.3.1 ab Seite 77).

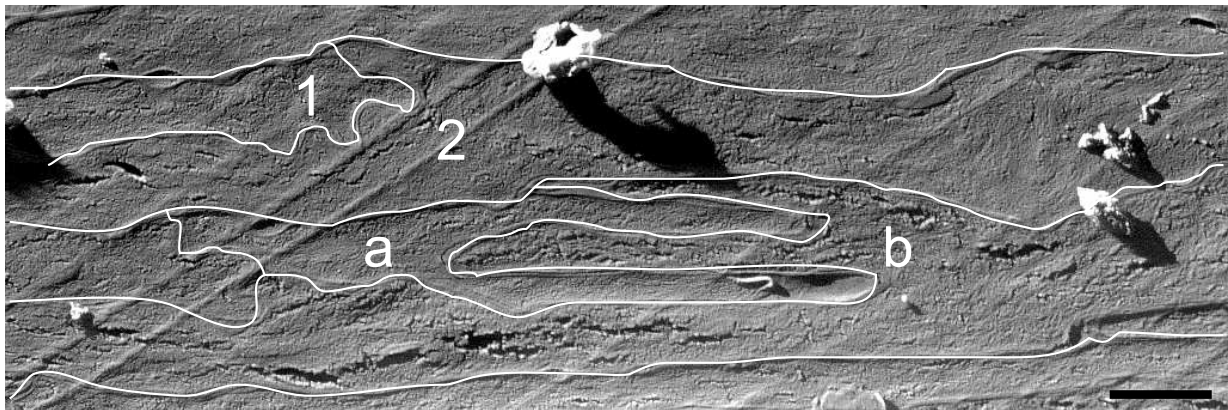


Abbildung 2.4: Zellverklammerungen im Stratum Corneum bilden sich meist zwischen zwei oder mehr Corneozyten aus (in diesem Fall zwischen den Zellen 1 und 2 sowie a und b). Maßbalken: 1 μm

2.2 Elektronenmikroskopie

Im Elektronenmikroskop entstehen die Bilder durch Interaktionen der Elektronen mit der Probe. Entsprechend werden in Abschnitt 2.2.1 einige grundlegende Wechselwirkungen zwischen Elektronen und Materie diskutiert, die in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind. Rein phänomenologisch werden allgemein die Elektronen, die auf der gleichen Probe-seite austreten, auf der sie auch eingestrahlt werden (also "reflektiert" werden), von denen unterschieden, die auf der gegenüberliegenden austreten ("transmittiert" werden). Obwohl anschaulich, ist diese Unterscheidung vom physikalischen Standpunkt willkürlich und wenig präzise, denn sie sagt nichts über die zugrundeliegenden Wechselwirkungen oder ihre Häufigkeit aus.

Tendenziell tragen die reflektierten Elektronen Informationen aus der obersten Schicht der Probe und lassen daher teilweise Rückschlüsse auf die Topographie zu. Man unterscheidet dabei verschiedene Klassen (Sekundärelektronen und Rückstreuungselektronen), die unterschiedliche Energien, unterschiedliche Winkelverteilungen und ein unterschiedliches

Auflösungsvermögen haben. Ihre Detektion und die darauf aufbauende Rasterelektronenmikroskopie wird in den Kapiteln 2.2.2 und 2.2.3 diskutiert. Bei dünnen Proben steigt der Anteil der transmittierten Elektronen. Sie werden weniger durch die Topographie beeinflusst als viel mehr durch die Materie, die sie durchlaufen. Kapitel 2.2.4 gibt einen Überblick. Ihre Winkel- und Energieverteilungen werden im Transmissionselektronenmikroskop genutzt, um unterschiedliche Aspekte des Probenvolumens zu analysieren. Vom Aufbau ähnelt es einem Lichtmikroskop, bei dem statt Photonen allerdings Elektronen verwendet werden. Kapitel 2.2.5 stellt exemplarisch die Detektoren und Methoden der Transmissionselektronenmikroskopie vor, die im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden. Schließlich gibt es noch die Raster-Transmissionselektronenmikroskope, die sowohl die emittierten als auch die transmittierten Elektronen detektieren. Es lassen sich allerdings dort (wie auch im Transmissionselektronenmikroskop) keine massiven gefrorenen Proben untersuchen.

2.2.1 Wechselwirkungen zwischen Probe und Elektronen

Ein Elektron wechselwirkt beim Durchgang durch Materie mit den darin enthaltenen Atomen. Weil der Elektronenstrahl dadurch insgesamt eine Aufweitung erfährt, wird dies auch *Streuung* genannt. Bleibt die Summe der kinetischen Energien und die Summe der Impulse der Wechselwirkungspartner erhalten, so spricht man von *elastischer Streuung*. Bei *inelastischer Streuung* hingegen wird ein Teil der kinetischen Energie in Atom- und/oder Elektronenanregung oder Gitterschwingungen konvertiert. Dabei bleibt natürlich die Gesamtenergie und der Gesamtimpuls erhalten. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wesentlichen Wechselwirkungen gegeben werden; ausführlicher wird die Elektron-Probe-Wechselwirkung in [43] und [44] diskutiert.

Die Ablenkung eines Primärelektrons aus seiner ursprünglichen Bahn wird durch den sogenannten *differentiellen Wirkungsquerschnitt* $\frac{d\sigma}{d\Omega}(\theta)$ beschrieben. Er gibt die Wahrscheinlichkeit $d\sigma$ an, daß das Primärelektron um einen Winkel θ in einen Raumwinkel $d\Omega$ gestreut wird und muß mittels Wellenmechanik berechnet werden. Der gesamte Wirkungsquerschnitt σ ergibt sich durch Integration über alle Raumwinkelbereiche $d\Omega = 2\pi \sin(\theta) d\theta$:

$$\sigma = \int_{\theta=0}^{\pi} \frac{d\sigma}{d\Omega}(\theta) 2\pi \sin(\theta) d\theta \quad (2.1)$$

Er kann beispielsweise benutzt werden, um den Anteil der gestreuten Elektronen zu berechnen.

Elastische Streuung

Die Wellenfunktion des Elektrons kann aus der Schrödingergleichung exakt berechnet werden; beispielsweise durch Partialwellenansatz. Bricht man diesen nach dem ersten nichttrivialen Term ab, so erhält man die BORNsche Näherung. Sie ist nicht mehr gültig für Atomkerne höherer Ordnung oder Mehrfachstreuungen, erlaubt aber eine analytische Lösung für einfache Modellpotentiale V .

Für die Wellenfunktion erhält man in dieser Näherung die Überlagerung der einfallenden ungestörten ebenen Welle (in z -Richtung mit der Wellenzahl k_0) mit einer Kugelwelle der Wellenzahl k nach Streuung:

$$\Psi_{\text{el}} = \Psi_0 \left[\exp(2\pi i k_0 z) + i f(\theta) \cdot \frac{\exp(2\pi i k r)}{r} \right]$$

Der elastische differentielle Wirkungsquerschnitt ergibt sich dann zu:

$$\frac{d\sigma_{\text{el}}}{d\Omega}(\theta) = |f(\theta)|^2$$

Weil der elastische (wie übrigens auch der inelastische Wirkungsquerschnitt) mit steigendem Streuwinkel stark abfällt (das heißt Streuungen um große Winkel sind selten), wird $\frac{d\sigma}{d\Omega}(\theta) = |f(\theta)|^2$ sehr klein für große θ , sodaß die obere Integrationsgrenze in Gleichung 2.1 auch durch ∞ ersetzt werden kann. Da im Integranden nur kleine θ beitragen, kann zusätzlich $\sin(\theta)$ durch θ ersetzt werden, sodaß sich σ näherungsweise ausdrücken läßt als:

$$\sigma_{\text{el}} \cong 2\pi \int_{\theta=0}^{\infty} \frac{d\sigma_{\text{el}}}{d\Omega} \theta d\theta = 2\pi \int_{\theta=0}^{\infty} |f(\theta)|^2 \theta d\theta \quad (2.2)$$

Setzt man beispielsweise die Wechselwirkung mit einem einzigen Atom der Kernladungszahl Z im WENTZELschen Atommodell an, so ergibt sich das Potential zu $V(r) = -\frac{e^2 Z}{4\pi\epsilon_0} \exp(-\frac{r}{R})$ mit $R = a_H Z^{-1/3}$ und dem BOHRschen Radius a_H . Der differentielle Wirkungsquerschnitt von Elektronen der kinetischen Energie E , Ruheenergie E_0 und Wellenlänge λ ergibt sich dann zu:

$$\frac{d\sigma_{\text{el}}}{d\Omega}(\theta) \cong \frac{4Z^2 R^4 (1 + E/E_0)^2}{a_H^2} \frac{1}{[1 + (\theta/\theta_{\text{el}})^2]^2} \quad (2.3)$$

wobei $\theta_{\text{el}} = \frac{\lambda}{2\pi R}$ ist. Bei dem charakteristischen Winkel θ_{el} fällt der differentielle elastische Wirkungsquerschnitt auf ein Viertel des Wertes für $\theta = 0$ ab.

Integration über θ gemäß Gleichung 2.2 liefert den gesamten Wirkungsquerschnitt in der BORNschen Näherung zu:

$$\sigma_{\text{el}} \cong \frac{h^2 Z^{4/3}}{\pi E_0^2 \beta^2} \propto Z^{4/3} \quad (2.4)$$

mit $\beta = \frac{v}{c}$.

Die so berechneten Werte stimmen aber nur mäßig mit realen Elektronenstreuexperimenten in Festkörpern überein. Grund hierfür ist die nicht zu vernachlässigende Mehrfachstreuung. Zudem ist die Proportionalität zu $Z^{4/3}$ ein typisches Resultat der BORNschen Approximation.

Inelastische Streuung

Bei der **inelastischen Streuung** an Atomen können folgende Wechselwirkungen unterschieden werden:

- Anregung von Moleküloszillationen in Gasen oder Phononenschwingungen der Atome in Festkörpern. Der Energieverlust liegt typischerweise zwischen 20 meV und 1 eV.
- Intra- und Interband-Anregungen der äußeren Atomelektronen sowie Anregung der Valenz- und Leitungselektronen zu Plasmaschwingungen (insbesondere im freien Elektronengas der Metalle). Die meisten dieser Anregungen zeigen relativ breite Energieverlustmaxima im Energieverlustbereich von 1 eV und 50 eV.
- Anregung von inneren Elektronen der Atome in unbesetzte Energiezustände oberhalb der Fermikante. Der Energieverlust muß dafür mindestens so groß sein wie die Bindungsenergie der Elektronen (ca. 50 eV bis zu mehreren keV).

Für ausschließlich Inter- und Intra- und Interbandanregungen ergibt sich der differentielle Wirkungsquerschnitt näherungsweise zu:

$$\frac{d\sigma_{\text{inel}}}{d\Omega}(\theta) \cong \frac{\lambda^4 (1 + E/E_0)^2}{4\pi^4 a_{\text{H}}^2} Z \frac{1 - \left(1 + \frac{\theta^2 + \theta_{\text{inel}}^2}{\theta_{\text{el}}^2}\right)^{-2}}{(\theta^2 + \theta_{\text{inel}}^2)^2} \quad (2.5)$$

mit $\theta_{\text{inel}} = \frac{J}{4E}$, wobei J die mittlere Ionisationsenergie des Atoms ist. Näherungsweise ergibt sie sich als $J \cong 13,5 \cdot Z$ (in eV).

Verhältnis der Wirkungsquerschnitte zueinander

Sowohl bei der elastischen als auch bei der inelastischen Wechselwirkung wird der Abfall des differentiellen Wirkungsquerschnittes mit steigendem θ wesentlich bestimmt durch die Winkel θ_{el} bzw. θ_{inel} , die somit als charakteristische Abfallwinkel zu interpretieren sind. Typischerweise haben sie Werte von $\theta_{\text{el}} \cong 10$ mrad bzw. $\theta_{\text{inel}} \cong 0,1$ mrad. Dadurch, daß $\theta_{\text{inel}} \ll \theta_{\text{el}}$ ist, findet inelastische Streuung in einem wesentlich kleineren Winkelbereich statt als elastische Streuung (vergleiche auch Abbildung 2.5 auf der nächsten Seite).

Für große Streuwinkel θ , das heißt $\theta \gg \theta_{\text{el}}$ sowie $\theta \gg \theta_{\text{inel}}$, stehen die elastischen (2.3) und inelastischen (2.5) differentiellen Streuquerschnitte in einem einfachen Verhältnis:

$$\frac{\frac{d\sigma_{\text{inel}}}{d\Omega}}{\frac{d\sigma_{\text{el}}}{d\Omega}} = \frac{1}{Z} \quad (2.6)$$

Analog zu Gleichung 2.1 bzw. 2.2 kann daraus das Verhältnis der Gesamtwirkungsquerschnitte gewonnen werden:

$$\frac{\sigma_{\text{inel}}}{\sigma_{\text{el}}} \cong \frac{26}{Z} \quad (2.7)$$

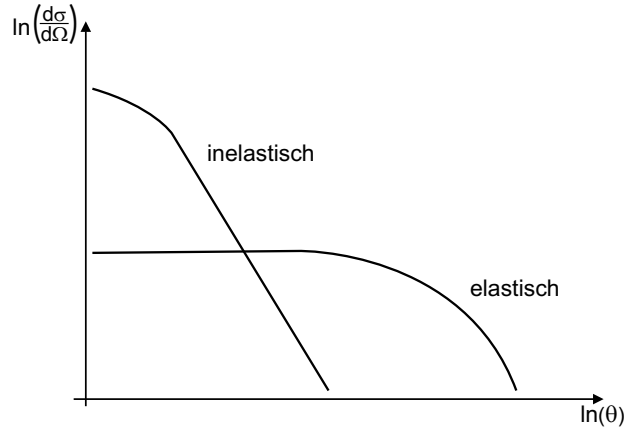


Abbildung 2.5: Qualitativer Verlauf des differentiellen Wirkungsquerschnittes $\frac{d\sigma}{d\Omega}(\theta)$ in doppelt-logarithmischer Auftragung gegen den Streuwinkel θ bei elastischer und inelastischer Streuung. Letztere findet in einem deutlich engeren Winkelbereich statt.

(Abbildung nach [44])

Experimentell ([45], [46]) ergibt sich das Verhältnis zu:

$$\frac{\sigma_{\text{inel}}}{\sigma_{\text{el}}} \simeq \frac{20}{Z} \quad (2.8)$$

Hieraus ergibt sich die wichtige Folgerung, daß leichte Elemente ($Z \leq 20$) Elektronen vorwiegend inelastisch und damit um kleine Winkel streuen. Bei schweren Elementen überwiegt hingegen die elastische Streuung um große Winkel. Dies hat Auswirkungen auf die unterschiedlichen Kontrastarten im Transmissionselektronenmikroskop (vergleiche Abschnitt 2.2.5 ab Seite 21) wie auch auf die Signalausbeute im Rasterelektronenmikroskop.

2.2.2 Rückgestreute und emittierte Elektronen

Haben die eintreffenden Primärelektronen eine Energie E_0 , dann haben die daraufhin von der Probe ausgehenden Elektronen eine Energieverteilung zwischen 0 und E_0 . Der qualitative Verlauf ist in Abbildung 2.6 auf der folgenden Seite dargestellt. Den zahlenmäßig größten Anteil stellen dabei jene Primärelektronen, die vor Austritt aus der Probe keine oder nur wenig Energie durch Stöße mit Atomkernen verloren haben. Dies sind die sogenannten Rückstreuelektronen (englisch: BSE für BackScattered Electrons), die den hochenergetischen Teil in Abbildung 2.6 ausmachen und bei Probenatomen mittlerer und hoher Ordnungszahl am häufigsten eine Energie zwischen 70 % und 90 % der Primärenergie besitzen. Mit steigender Energiedeposition der Primärelektronen sinkt auch die Wahrscheinlichkeit, daß sie die Probe verlassen können. Daher zeigt sich in der Energieverteilung ein Abfall in der Anzahl der austretenden Elektronen zu niedrigeren Energien hin. Unterhalb von etwa 50 eV (typischerweise zwischen 3 eV und 5 eV) gibt es aber einen scharfen

Anstieg durch Emission der sogenannten Sekundärelektronen. Dies sind im wesentlichen Elektronen der Probe, welche ihre kinetische Energie durch inelastische Stöße der Primärelektronen erhalten haben. Sekundärelektronen werden definiert als *alle* von der Probe ausgehenden Elektronen mit einer kinetischen Energie unter 50 eV. Obwohl auch einige Rückstreuelektronen in diesen Bereich abgebremst werden und so als Sekundärelektronen gezählt werden, sind sie aufgrund ihrer geringen Anzahl vernachlässigbar. Die Sekundärelektronen können durch Primärelektronen als auch durch Rückstreuelektronen erzeugt werden. Stammen Rückstreu- oder Sekundärelektronen direkt aus einer einzigen Inter-

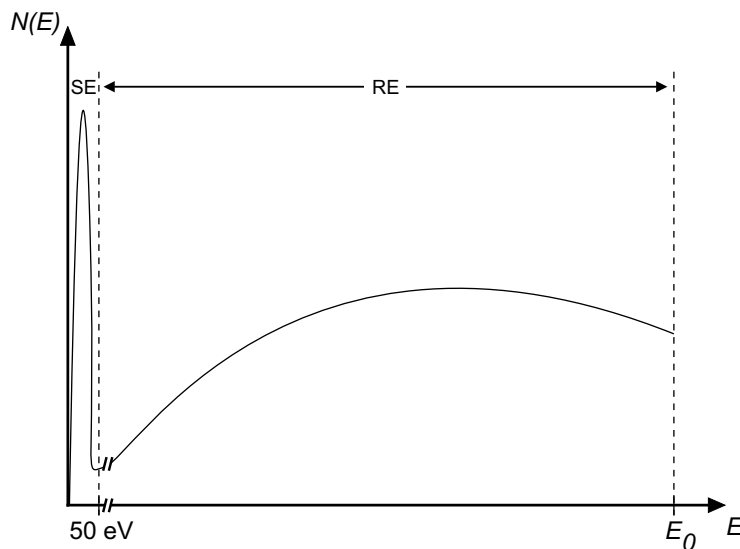


Abbildung 2.6: Energieverteilung der von der Probe ausgehenden Elektronen: SE: Sekundärelektronen; RE: Rückstreuelektronen; E_0 : Beschleunigungsspannung; $N(E)$: Anzahl der austretenden Elektronen einer bestimmten Energie E .

(Abbildung nach [47])

aktion des Primärstrahls mit der Materie, werden sie "erster Ordnung" genannt und mit BSE1 beziehungsweise SE1 bezeichnet (vergleiche Abbildung 2.7 auf Seite 17). Alle mehrfach in der Probe gestreuten Elektronen heißen zweiter Ordnung. Ferner grenzt man noch die Elektronen höherer Ordnung ab, die aus Wechselwirkungen mit Gerätewandungen oder anderer Materie außer der Probe entstehen. Im Rahmen dieser Arbeit werden sie zusammengefasst nur als BSEn bzw. SEen bezeichnet.

Eindring- und Austrittstiefen der Elektronen

Beim Weg durch Materie verliert ein Elektron beständig Energie, bis es entweder die Materie verlassen kann oder in ihr zum Stillstand kommt. Es hat damit nur eine endliche Reichweite. Die Eindringtiefe R ist definiert als der maximale Abstand normal zur Oberfläche, den ein Primärelektron zurücklegen kann. Im Wesentlichen legt sie das Probenvolumen fest,

in dem Energie durch den Elektronenstrahl deponiert wird (im Folgenden "Anregungsvolumen" genannt), und es somit potentiell zu Ionisationen und damit zu Strahlenschäden und lokaler elektrostatischen Aufladung kommen kann.

Die Austrittstiefe von Rückstreuelektronen ist ungefähr halb so groß wie R . Für die niedereenergetischen Sekundärelektronen beträgt die Austrittstiefe hingegen nur noch 1 nm-5 nm und ist umso kleiner, je besser die elektrische Leitfähigkeit der Probe ist. Mehrere 10% aller erzeugten Sekundärelektronen werden wieder absorbiert, bevor sie überhaupt austreten können.

Auflösungsvermögen der von der Probe ausgehenden Elektronen

Durch Elektronendetektoren (näher diskutiert in Abschnitt 2.2.3) kann nur die Gesamtsumme aller Sekundärelektronen (also SE1, SE2 und SEn) bzw. aller Rückstreuelektronen (BSE1, BSE2 und BSEn) nachgewiesen werden, aber es kann nicht zwischen ihnen diskriminiert werden.

Sekundärelektronen und Rückstreuelektronen erster Ordnung (SE1, BSE1) entstehen per definitionem ausschließlich durch Wechselwirkungen mit dem Primärelektronenstrahl. Sie tragen über die Probe Informationen mit höchster Ortsauflösung.

Sekundärelektronen und Rückstreuelektronen zweiter Ordnung (SE2, BSE2) werden durch Rückstreuelektronen erzeugt, die in Materie eine wesentlich größere Reichweite haben. Folglich tragen sie Informationen aus einem wesentlich größeren Volumen in sich und man erreicht mit ihnen eine geringere laterale Auflösung. Ihr Anteil am Gesamtsignal kann nur vermindert werden, indem man die Probenoberfläche speziell präpariert ("Elektronenstrahlbedampfung", Abschnitt 2.3.3 ab Seite 37).

Sekundärelektronen und Rückstreuelektronen höherer Ordnung (SEn) entstehen nicht ausschließlich durch Wechselwirkung mit der Probe und bewirken daher hauptsächlich ein Hintergrundrauschen im Signal. Ihr Anteil am Signal ist nur durch bauliche Veränderungen im Inneren des Elektronenmikroskops zu vermindern (beispielsweise Beschichtung der inneren Metallflächen mit einem elektronenabsorbierenden Material (Kohlenstoff)).

In einem homogenen Objekt tragen Sekundärelektronen aufgrund ihrer wesentlich geringeren Energie hauptsächlich Informationen aus der Oberfläche, während die energiereicheren Rückstreuelektronen dann auch Informationen aus tieferen Probenbereichen beinhalten.

2.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Im folgenden Abschnitt sollen die heute gebräuchlichsten Detektoren in der Rasterelektronenmikroskopie vorgestellt werden, die es erlauben, Bilder aus den von der Probe austretenden Elektronen zu generieren. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Entstehungen, Energien und Richtungen können dadurch unterschiedliche Aspekte der Probe dargestellt werden. Darauf wird in Abschnitt 2.2.3 ab Seite 19 eingegangen.

Detektoren im Rasterelektronenmikroskop

Je nach Bau- und Detektionsprinzip können Elektronendetektoren von der unterschiedlichen Energie und Richtung der von der Probe ausgehenden Elektronen Gebrauch machen. Im folgenden kann dies nur kurz umrissen werden; tiefere Einblicke gewähren [43], [47].

Everhart-Thornley-Detektor Der Everhart-Thornley Detektor ist einer der gebräuchlichsten Elektronendetektoren im Rasterelektronenmikroskop überhaupt. Herzstück ist ein metallisches Kollektorgitter, das auf ein definiertes elektrisches Potential gebracht werden kann (vergleiche Abbildung 2.7): Ein positives Potential bewirkt eine attraktive Saugspannung; ein negatives ist hingegen repulsiv. Direkt hinter dem Kollektorgitter schließen sich ein Szintillator, ein Photomultiplier und ein Signalvorverstärker an. Die Rückstreu-

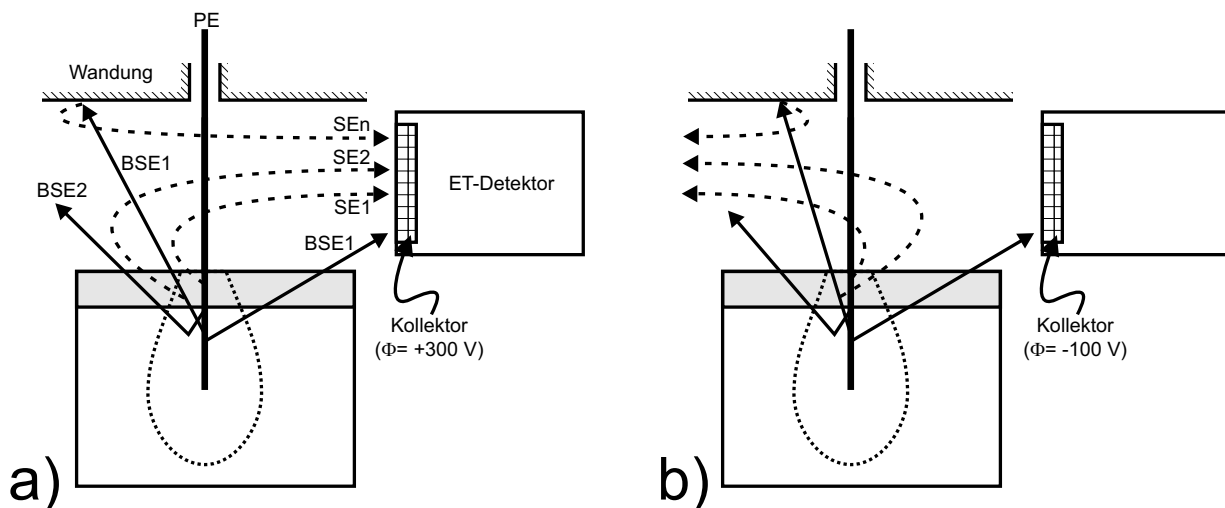


Abbildung 2.7: Aus der Probe ausgehende Elektronen erster bzw. zweiter Ordnung tragen den Index 1 bzw. 2 sowie n für alle höheren Ordnungen. a) Bei positivem Kollektorpotential Φ des Everhart-Thornley (ET) Detektors werden Sekundärelektronen (SE, gestrichelt) und Rückstreuelektronen (BSE, durchgezogene Linien) detektiert; bei negativem Potential (b) nur noch die Rückstreuelektronen. Grau unterlegt: Austrittstiefe für Sekundärelektronen; gepunktet: Anregungsvolumen des Primärelektronenstrahls (PE).

elektronen haben größtenteils eine so hohe kinetische Energie, daß sie vom Potential des Kollektors kaum beeinflusst werden. Anders die Sekundärelektronen: Ein positives Potential von $\Phi = +300 \text{ V}$ reicht aus, um diese niederenergetischen Elektronen zuverlässig in Richtung des Detektors zu beschleunigen – auch wenn sie sich ursprünglich nicht in seine Richtung bewegt haben und teilweise auch, wenn der direkte Weg verdeckt ist (vergleiche Abbildung 2.10 auf Seite 20). Somit wird ein Großteil aller Sekundärelektronen (SE1, SE2, SEn) detektiert, können dabei aber nicht unterschieden werden. Aufgrund der absoluten Häufigkeit wird das Signal allerdings wesentlich durch die SE2 geprägt. Wird das Potential auf -100 V abgesenkt, werden hingegen die Sekundärelektronen abgestoßen – selbst wenn

sie ursprünglich die Probenoberfläche in Richtung Detektor verlassen haben. Die Rückstreuелеktronen bleiben hingegen wie im vorigen Fall praktisch unbeeinflusst. Sie können aber aufgrund der Geometrie nur dann nachgewiesen werden, wenn sie die Oberfläche in Richtung Detektor verlassen haben und sich auf dem direkten Wege kein Hindernis befindet (Abbildung 2.7 auf der vorigen Seite). Das Signal der Rückstreuелеktronen durch den Everhart-Thornley-Detektor ist somit abhängig von seiner relativen Orientierung zur Probenoberfläche sowie dem Einfallswinkel des Primärelektronenstrahls und stellt damit eine Mischung aus Topographie- und Materialkontrast dar.

Konzentrischer Ringdetektor für Rückstreuелеktronen Die sogenannten konzentrischen Ringdetektoren werden symmetrisch zum Primärelektronenstrahl möglichst dicht über die Probenoberfläche plaziert (vergleiche Abbildung 2.8), um Rückstreuелеktronen aus einem großen Raumwinkelbereich (nahezu dem gesamten oberen Halbraum) detektieren zu können. Die Oberflächennormale der Probe spielt daher – im Gegensatz zum Everhart-Thornley Detektor – kaum eine Rolle und es ergibt sich fast ein ungestörtes Bild des Materialkontrastes. Aufgebaut sind die Ringdetektoren entweder aus dotiertem Halbleitermaterial, in dem die von der Probe ausgehenden Elektronen Elektronen-Lochpaare und damit einen detektierbaren Impuls erzeugen, oder aus einem Szintillatormaterial ähnlich wie im Everhart-Thornley Detektor.

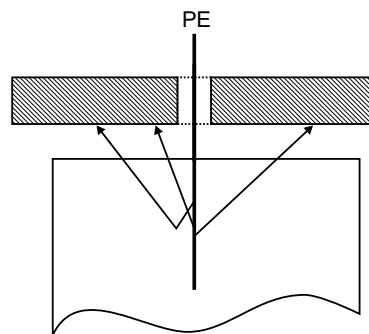


Abbildung 2.8: Konzentrischer Ringdetektor (schraffiert): er wird dicht über der Probe plaziert und detektiert daher nahezu alle Rückstreuелеktronen (durchgezogene Pfeile). PE: Primärelektronenstrahl

MEDOL-InLens-Detektor Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Detektoren befinden sich die sogenannten InLens-Detektoren direkt in der Elektronensäule des Rasterelektronenmikroskops. Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein MEDOL*-Detektor verwendet (vergleiche Abbildung 2.9 auf der folgenden Seite). Von der Probenoberfläche ausgehende Sekundärelektronen befinden sich im Feld der untersten elektrostatischen Linse (bei-

* Magnetic Electron Detection Objective Lens

spielsweise $\Phi_{\text{Linse}} = -5 \text{ kV}$) und dem des Detektors selbst ($\Phi_{\text{InLens}} = +8 \text{ kV}$). Sekundärelektronen, die die Probenoberfläche antiparallel zum Primärelektronenstrahl verlassen, werden durch die Überlagerung dieser Potentiale angezogen und beschleunigt. Sie können daher statt mit einem Everhart-Thornley-Detektor auch mit einem Halbleiterdetektor nachgewiesen werden. Ist der Austrittswinkel der Elektronen aus der Oberfläche zu schräg oder verlassen sie sie zu weit entfernt vom Primärelektronenstrahl, gelangen sie durch die spezielle Geometrie des Linsensystems nicht zum Detektor. Sein Signal wird somit hauptsächlich durch die Sekundärelektronen erster Ordnung nahe dem Primärstrahl bestimmt – obwohl natürlich auch höhere Ordnungen und Rückstreuелеktronen beitragen. Die Grundlagen für das Design legte Joachim Zach [48], [49] mit einem rein elektrostatischen System, das ohne magnetische Komponenten aufgebaut war (EDOL-Detektor: Electron Detection Objective Lens-Detektor).

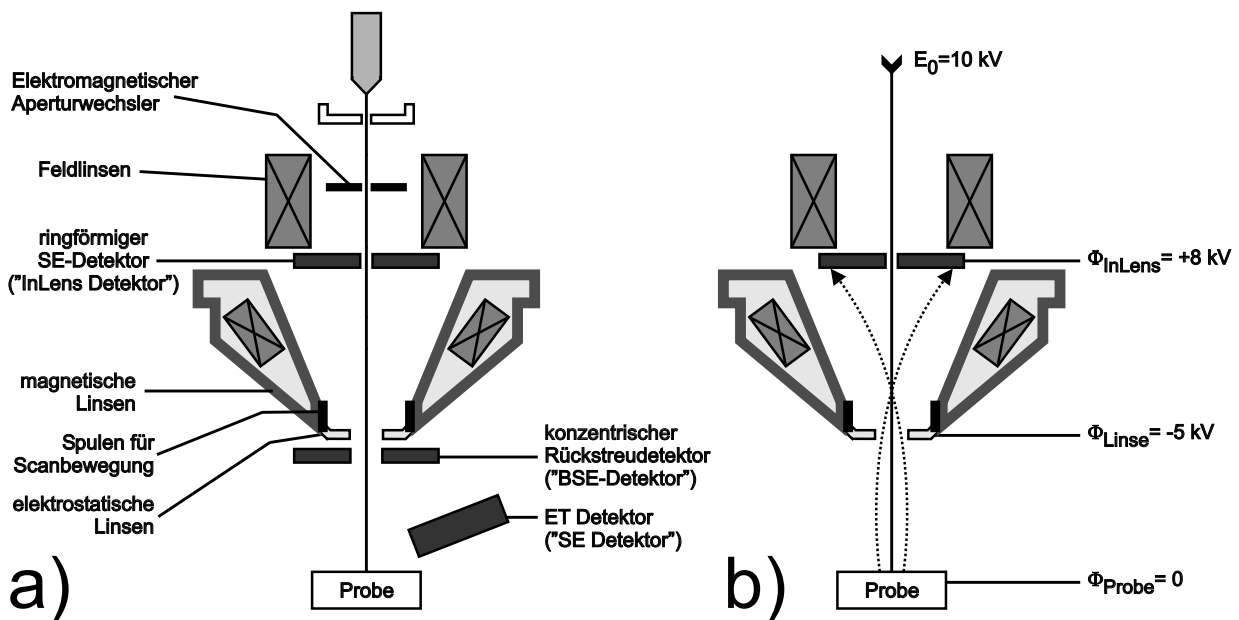


Abbildung 2.9: Säule eines Rasterelektronenmikroskops mit MEDOL-Detektor: a) Schematische Übersicht über die Säule eines Rasterelektronenmikroskops inklusive dreier eingebauten Detektoren. b) Detektionsprinzip des InLens Detektors samt der Potentiale der beteiligten Elemente bei einer kinetischen Energie der Primärelektronen von $E_0 = 10 \text{ keV}$. Die Flugbahn der detektierten Sekundärelektronen ist gestrichelt gezeichnet.

Ein alternatives Design eines InLens-Detektors beschleunigt die Sekundärelektronen nahe dem Primärelektronenstrahl entlang einer Schraubenlinie in Richtung eines Everhart-Thornley-Detektors, der in der Elektronensäule platziert ist.

Kontrastmechanismen

Topographiekontrast durch Sekundärelektronen Durch ihre geringe Austrittstiefe hängt die Ausbeute der Sekundärelektronen – bei sonst gleichem Probenmaterial und gleicher Energie des Primärelektronenstrahls – sehr stark von der lokalen Topographie ab (vergleiche Abbildung 2.10). Das Anregungsvolumen, in dem durch den Primärelektronenstrahl

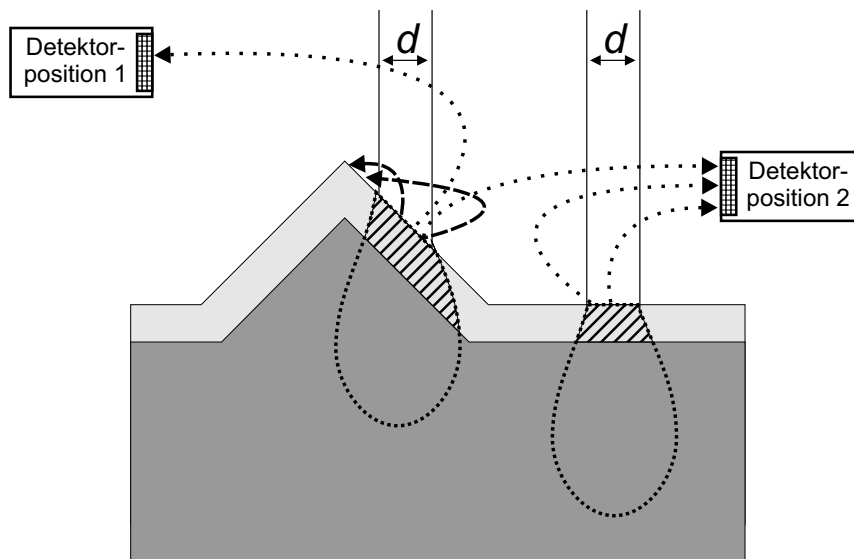


Abbildung 2.10: Kantenkontrast für Sekundärelektronen: Gezeigt ist das Anregungsvolumen (gepunktet) des Primärelektronenstrahls (Durchmesser d), die Austrittstiefe der Sekundärelektronen (hellgrau) und die Schnittfläche beider Gebiete (schraffiert). In Abhängigkeit von der lokalen Topographie gelangen Sekundärelektronen entweder zum Detektor (gepunktete Flugbahnen) oder werden auf ihrem Weg wieder absorbiert (gestrichelte Flugbahnen). Daher ist die Effizienz der Everhart-Thornley-Detektoren mit positivem Kollektorpotential bezüglich der Sekundärelektronenausbeute an Position 1 geringer als an Position 2. Einzelheiten im Text.

Energie eingebracht wird und damit Sekundärelektronen erzeugt werden, ist zwar überall gleich. Sie müssen allerdings nahe der Oberfläche erzeugt werden, um aus der Probe austreten und detektiert werden zu können. Das Detektorsignal wird daher nur von dieser schmalen Oberflächenschicht des Anregungsvolumens bestimmt (in Abbildung 2.10 schraffiert), welche ihrerseits stark von der lokalen Topographie – insbesondere der Flächenneigung im Anregungsvolumen – abhängt. Unterschiedliche lokale Absorptionen der Probenoberfläche für Elektronen sowie lokale elektrostatische Aufladungen beeinflussen zusätzlich die Sekundärelektronenausbeute. Das alles gilt allerdings nur, wenn der Durchmesser des Elektronenstrahls kleiner ist als die Strukturdetails der Topographie. Im umgekehrten Fall können die Details nicht mehr aufgelöst werden und es kommt zu einer Mittelung über den Strahlquerschnitt.

Materialkontrast durch Rückstreuelektronen Durch ihre höhere Energie haben Rückstreuelektronen eine wesentlich größere Austrittstiefe. Bei ihrer Entstehung haben

sie meist eine ähnliche Flugbahn wie die Primärelektronen. Um die Oberfläche zur Detektion verlassen zu können, müssen sie in der Probe daher abgelenkt werden; dies wird umso wahrscheinlicher, je mehr Materie sie durchlaufen haben. Die tatsächlich detektierten Rückstreuelektronen stammen also vorzugsweise von tieferen Probenstellen und werden kaum durch die Topographie der Oberfläche beeinflusst. Da hauptsächlich die Wechselwirkung mit Atomkernen der Probe für die Rückstreuelektronen eine Rolle spielt, wird ihre Raumwinkel- und Energieverteilung empfindlich von der Kernladungszahl beeinflusst (Materialkontrast): Je höher diese ist, umso mehr detektierbare Rückstreuelektronen werden erzeugt.

Ein Sonderfall ist hier allerdings, wenn die Oberfläche der Probe mit Elementen von wesentlich höherer Ordnungszahl beschichtet wird. Dann wird die Signalentstehung der Rückstreuelektronen von dem eigentlichen Probenmaterial in diese Schicht verlagert, die ihrerseits die Topographie der Oberfläche widerspiegelt.

2.2.4 Transmittierte Elektronen

Das Energieverlustspektrum der transmittierten Elektronen ist sehr charakteristisch für die jeweilige Probe. Grundsätzlich sieht es aber für dünne Proben (das heißt dünner als 100 nm bei einer Beschleunigungsspannung der Primärelektronen von 100 kV) aus wie in Abbildung 2.11 auf der nächsten Seite dargestellt: Der überwiegende Teil der Elektronen hat entweder überhaupt nicht interagiert oder wurde elastisch oder inelastisch mit nur kleinen Winkeln gestreut und hat damit keinen oder nur einen sehr geringen Energieverlust erfahren. Zusammengefaßt werden sie alle dem ungestreuten Primärelektronenstrahl zugeordnet (im englischen auch "Zero-loss"-Elektronen genannt). Denn praktisch ist es unmöglich, diese nicht oder nur schwach wechselwirkenden Elektronen von den Primärelektronen zu unterscheiden, die schon bei ihrer Erzeugung eine nichtverschwindende Winkel- und Energieverteilung haben. Zu höheren Energieverlusten hin schließt sich der Anteil der Plasmonenanregung und anderer charakteristischer Wechselwirkungen an, die bei dem verwendeten Maßstab von Abbildung 2.11 allerdings nicht erkennbar sind.

2.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Im Transmissionselektronenmikroskop treten prinzipiell zwei Wechselwirkungen der Elektronen mit Materie auf, die bei ihrer Detektion zu unterschiedlichen Intensitäten und damit zum Entstehen von Kontrast in den Abbildungen beitragen: Zum einen können die Primärelektronen als klassisches Teilchen an Atomkernen gestreut und stark aus ihrer Bahn abgelenkt werden. Dies geschieht primär an Schwermetallkernen und großen Strukturdetails (ab circa 10 nm). Dies ist der sogenannte *Streuabsorptionskontrast*. An kleinen Strukturen und an leichten Kernen hingegen erfahren die Elektronen als Teilchen nur geringe Auslenkungen aus ihrer Bahn, da sie dort hauptsächlich inelastisch gestreut werden (vergleiche Abschnitt 2.2.1 ab Seite 13 und insbesondere Gleichung 2.8). Als Welle erfährt das Elektron dabei aber eine strukturspezifische Phasenänderung, die zu Interferenz mit den ungestreuten Elektronen und schließlich zur Kontrastentstehung führt (dem *Phasenkontrast*). Beides

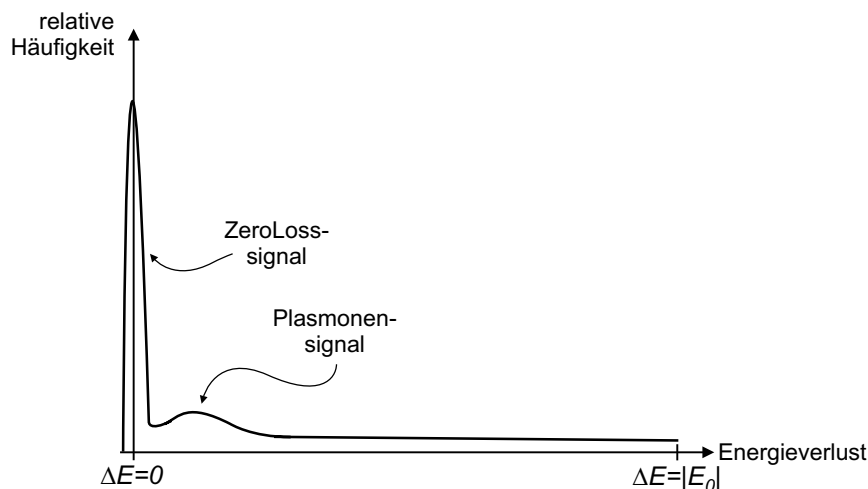


Abbildung 2.11: Energieverlustspektrum der transmittierten Elektronen. E_0 : Energie des Primärelektronenstrahls.

soll im folgenden näher diskutiert werden.

Durch Transmissionselektronenmikroskopie ist es auch möglich, die dreidimensionale innere Struktur der Probe zu visualisieren: Dazu werden Dünnschnitte (Dicke bis ungefähr 200 nm) schrittweise über einen möglichst großen Winkelbereich rotiert. Wird dann für jeden Schritt ein Bild aufgenommen, läßt sich daraus schließlich am Computer ein dreidimensionales Abbild rekonstruieren. Diese Mikroskopietechnik wird TEM-Tomographie genannt. Als Anwendungsbeispiel sei [50] genannt.

2.2.6 Streuabsorptionskontrast

In einem Transmissionselektronenmikroskop können gezielt diejenigen Elektronen durch Blenden absorbiert werden, die nach Durchgang durch die Probe um einen bestimmten Mindestwinkel abgelenkt wurden. Dadurch kann man vorgeben, welche Elemente am meisten zum Kontrast im detektierten elektronenmikroskopischen Bild beitragen. Beispielhaft soll das an einer idealen Probe diskutiert werden, die nur die Elemente Blei (Pb) und Kohlenstoff (C) enthält (vergleiche Abbildung 2.12 auf der folgenden Seite). Aus Gleichung 2.3 auf Seite 12 geht hervor, daß der elastische Streuquerschnitt mit der zweiten Potenz der Kernladungszahl Z wächst. Die Streuung um einen bestimmten Winkel θ ist damit für ein Bleiatom ($Z = 82$) circa 180 mal häufiger als für ein Kohlenstoffatom ($Z = 6$). Dies trifft insbesondere bei hohen Streuwinkeln zu. Strahlt man die Primärelektronen nun auf eine Probe endlicher Dicke, so bewirken alle Wechselwirkungen (inklusive der inelastischen Streuung) eine winkelabhängige Intensitätsverteilung. Zusätzlich zu den (nicht dargestellten) Zeroloss-Elektronen zeigt in dem gewählten Beispiel das Spektrum zwei Maxima, die den Wechselwirkungen mit Kohlenstoff und Blei entsprechen (Abbildung 2.12a). Blendet

man nun alle Elektronen mit einem höheren Ablenkwinkel als θ_0 aus (Abbildung 2.12b), so tragen zu der entstehenden Intensitätsverteilung hauptsächlich die Kohlenstoffatome bei. Weil die Gesamtintensität durch die Zeroloss-Elektronen sehr hoch ist, spricht man vom Hellfeldsignal. Detektiert man hingegen nur transmittierte Elektronen, die mindestens um einen Winkel θ_0 abgelenkt werden (Abbildung 2.12c), so erhält man das sogenannte Dunkelfeldsignal, zu dem insbesondere das Blei beiträgt. Prinzipiell kann man so bestimmen, ob hauptsächlich schwere oder leichte Elemente zur Kontrastentstehung beitragen.

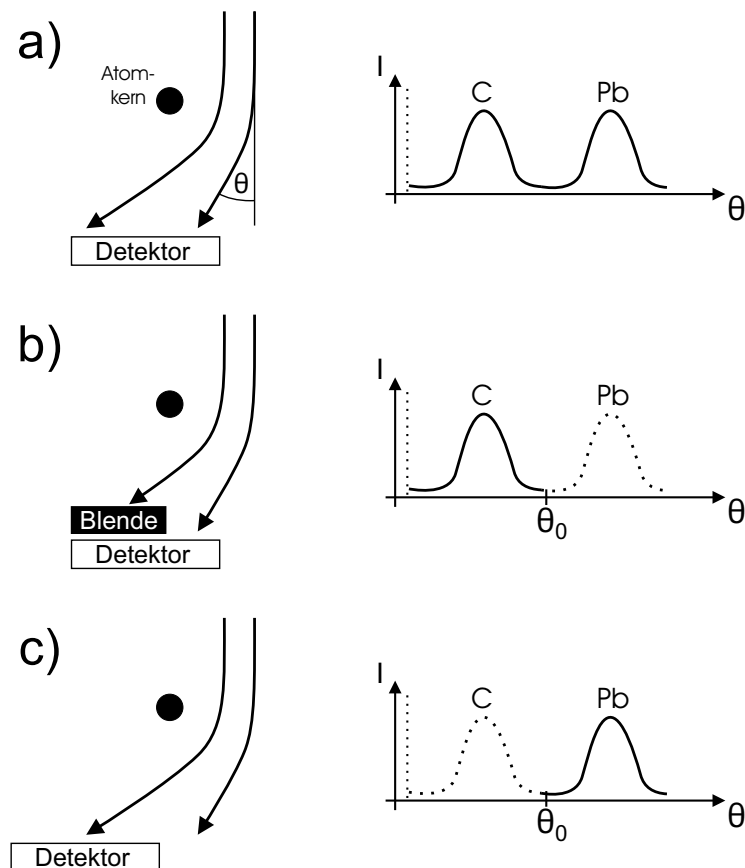


Abbildung 2.12: Streuabsorptionskontrast im Transmissionselektronenmikroskop: Die elastische Streuung am Atomkern bewirkt eine Winkelabhängigkeit der detektierten Intensität $I(\theta)$ (jeweils auf der rechten Seite ohne die Zeroloss-Elektronen dargestellt). Dabei überlagern sich die Einflüsse der beteiligten Atome (Kohlenstoff und Blei) (a). Bei schweren Elementen (zum Beispiel Blei) kommen große Streuwinkel häufiger vor als bei leichten Elementen. Werden transmittierte Elektronen hohen Streuwinkels mit einer Blende herausgefiltert, tragen hauptsächlich leichtere Elemente zum Signal bei (b). Wird hingegen nur bei hohen Winkeln detektiert, überwiegt der Einfluß der leichten Elemente (c).

2.2.7 Phasenkontrast

In Proben, die hauptsächlich aus leichten Elementen mit niedriger Kernladungszahl Z aufgebaut sind, spielt der Streuabsorptionskontrast keine wesentliche Rolle. Insbesondere ist dies bei biologischen Proben der Fall. Die Elektronen werden nur wenig aus ihrer ursprünglichen Bahn abgelenkt. Dafür erfahren sie aber durch ihre Wechselwirkungen und die leicht veränderte Flugbahn eine Phasenverschiebung, die zu Interferenzerscheinungen mit den ungestreuten Elektronen(wellen) führt (entsprechend heißen die untersuchten Objekte dann "Phasenobjekte"). Bei einer Beschleunigungsspannung der Primärelektronen von 100 kV (entsprechend einer Wellenlänge von 3,7 pm) wird dann der Kontrast bestimmt von Strukturen unterhalb von 5 nm. Dies entspricht im reziproken Raum, der für diese Betrachtungen geeigneter ist, Ortsfrequenzen R oberhalb von $0,2 \text{ nm}^{-1}$. Zu der Phasenverschiebung trägt neben R und der Wellenlänge der Elektronen λ auch die gerätespezifische Öffnungsfehlerkonstante C_S des Elektronenmikroskopes bei. Sie hat typischerweise einen Wert von $C_S \approx 1 \text{ mm}$. Nach SCHERZER (vergleiche auch [44]) ergibt sich dann die beobachtete Phasenverschiebung γ zu:

$$\gamma = \frac{\pi}{2} (C_S \cdot \lambda^3 R^4 - 2\Delta z \cdot \lambda \cdot R^2) \quad (2.9)$$

Vom Experimentator am leichtesten zu variieren ist dabei der *Defokus* Δz , das heißt der Abstand des aktuell eingestellten Fokus vom optimalen Fokus auf der Probe. Für die Interferenz ist $\sin(\gamma)$ entscheidend:

$$B(R) := -2 \sin(\gamma) = -2 \sin \left[\frac{\pi}{2} (C_S \cdot \lambda^3 R^4 - 2\Delta z \cdot \lambda \cdot R^2) \right] \quad (2.10)$$

Die Funktion $B(R) = -2 \sin(\gamma)$ heißt *Phasenkontrastübertragungsfunktion*; sie ist in Abbildung 2.13 auf der folgenden Seite exemplarisch aufgetragen. Bei kleinen Werten für R (also großen Strukturen) ist sie betragsmäßig klein, was bedeutet, daß von den zugehörigen Strukturen wenig Kontrast ausgeht und diese schlecht abgebildet werden. Bei hohen Ortsfrequenzen R oberhalb des ersten Nulldurchganges hingegen oszilliert die Funktion immer schneller zwischen positiven und negativen Werten, sodaß es bereits bei Strukturen von leicht unterschiedlicher Größe zu einer vollständigen Kontrastumkehr kommen kann, sodaß die entstehenden Bilder falsch gedeutet werden können. Im praktischen Betrieb sind nur solche Strukturen gut darstellbar, die eine Ortsfrequenz vor dem ersten Nulldurchgang haben und bei denen die Phasenkontrastfunktion möglichst nahe bei 2 ist. Dieser darstellbare Bereich ist seinerseits empfindlich von Δz abhängig. Ein Abschätzen dieses Wertes erlaubt gleichzeitig ein Abschätzen der real erreichten Auflösung. Bei einem Defokus von $\Delta z = 0$ ist allerdings auch der Kontrast (bei sonst gleichen Parametern) minimal und in der Praxis meist zu gering, sodaß man einen etwas von Null verschiedenen Wert benutzt (*Unterfokus**). Ein Überfokus hingegen bewirkt eine Kontrastinversion im Vergleich zum Streuabsorptionskontrast und ist daher in der Praxis meist ungeeignet.

* beispielsweise lassen sich Strukturen von 1,5 nm-2 nm am besten mit einem Defokus von $\Delta z \cong 400 \text{ nm}$ abbilden.

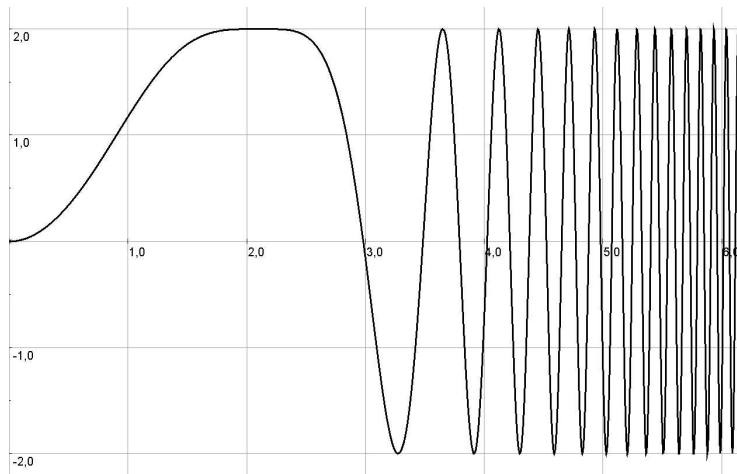


Abbildung 2.13: Phasenkontrastübertragungsfunktion $B(R) = -2 \sin(\gamma)$ (Ordinate) in Abhängigkeit von der Ortsfrequenz R in pm (Abzisse) bei einem Öffnungsfehler von $C_S = 1$ mm, einer Elektronenwellenlänge von $\lambda = 3,7$ pm (entspricht 100 keV Elektronen) und einen Defokus von $\Delta z = \sqrt{C_S \cdot \lambda} = 60,8$ nm.

Durch die praktisch sehr begrenzte Qualität der elektromagnetischen Linsen (inhomogenes magnetisches Feld durch nicht perfekte Eisen-Einkristall-Kerne) im Transmissionselektronenmikroskop ist die Phasenkontrastübertragungsfunktion bei hohen Ortsfrequenzen (näherungsweise) exponentiell gedämpft:

$$B_{\text{real}}(R) = B(R) \cdot e^{-\alpha R}$$

2.3 Präparation von biologischen Proben für die Elektronenmikroskopie

Weil für die Präparation von biologischen Proben ihr intrinsischer Wassergehalt wie auch ihre Stoffwechselaktivität beachtet werden muß, sind die heutzutage angewandten Präparationsmethoden so vielfältig wie die Proben selbst. Im folgenden können nur die in dieser Dissertation tatsächlich verwendeten Verfahren diskutiert werden; als weiterführende Literatur seien dem geneigten Leser beispielsweise [51], [52], [53] und [54] empfohlen.

Prinzipiell gliedert sich die Präparation in zwei Teile: Der Beendigung sämtlicher Stoffwechselprozesse und der Aufbereitung der Probe für die jeweilige Mikroskopie. Beide Teile müssen je nach Fragestellung und Probe sorgfältig ausgewählt werden.

Bleibt eine **Beendigung sämtlicher Stoffwechselprozesse** aus, so würde sich die Probe von den kleinsten Organellen aufwärts weiterhin kontinuierlich verändern und umorganisieren, sodaß man nur noch die Überlagerung eines Kontinuums von Zuständen analysieren könnte. Um dies zu vermeiden, kann beispielsweise die *chemische Fixierung* eingesetzt werden, bei der in die Probe reaktive Substanzen eingebracht werden, die mit dem Biomaterial

chemische Verbindungen eingehen und es so miteinander vernetzen und damit fixieren. Es ist bekannt, daß dabei der Hydratationszustand und die Ultrastruktur der Probe verändert werden* [57], [58]. Weil aber die Hautproben im Rahmen dieser Dissertation insbesondere in ihrem Hydratationszustand erhalten und mikroskopiert werden sollten, schloß sich eine chemische Fixation aus. Gleiches trifft auf eine vollständige Entfernung des Wassers zu, die natürlich auch sämtliche Stoffwechselprozesse beenden würde.

Eine andere Möglichkeit ist die *physikalische Arretierung*, bei der das ubiquitäre Wasser und mit ihm die ganze Probe eingefroren wird. Dies dauert (je nach Gefriertechnik) zwischen einigen Millisekunden bis zu wenigen Sekunden und ist damit schneller als die chemische Fixierung, sodaß alle Probenbereiche nahezu zum gleichen Zeitpunkt arretiert werden. Zudem ist es ein nicht-invasives Verfahren, bei dem keine reaktiven Substanzen in das biologische Material eingebracht werden – insbesondere bleibt damit der Hydratationszustand zuverlässig erhalten. Daher wurden die Proben in dieser Dissertation ausschließlich physikalisch arretiert.

Ein Problem ist allerdings, daß sich Wasser normalerweise bei Gefrieren ausdehnt und es so zu physikalischen Zerstörungen kommt. Dem kann beispielsweise durch Zugabe eines chemischen Gefrierschutzes entgegengewirkt werden (etabliert sind Succrose oder Polyethylenglycol) [59], [60], [61]) – der allerdings auch die Hydratation deutlich beeinflussen kann. Durch die Ausnutzung der außergewöhnlichen physikalischen Eigenschaften des Wassers (Abschnitt 2.3.1 ab Seite 27) kann ein Ausdehnen beim Gefrieren durch spezielle Gefriertechniken auch ohne chemische Zusätze verhindert werden. Zwei dieser Techniken wurden in dieser Arbeit verwendet und werden in Abschnitt 2.3.2 ab Seite 30 vorgestellt. Aufgrund der Fülle der möglichen **Aufbereitungen der Proben** können an dieser Stelle nur die beiden tatsächlich benutzten diskutiert werden: Bei der *Cryopräparation* bleibt die Probe die ganze Zeit im gefrorenen Zustand, ohne daß ihre innere Struktur modifiziert wird. Bei allen Schritten der Präparation und beim Mikroskopieren muß sie also ausreichend gekühlt[†] und vor eventuellen Eiskontaminationen durch die Luftfeuchtigkeit geschützt werden. Damit ist sie nur begrenzt lagerbar. Auf der anderen Seite kann eine komplette Cryopräparation samt Mikroskopie in nur einem Tag abgeschlossen werden. Auf den genauen Ablauf inklusive der nötigen theoretischen Grundlagen wird in Abschnitt 2.3.3 ab Seite 33 eingegangen. Wegen der genannten Vorteile wurden die Hydratationsuntersuchungen ausschließlich an cyopräparierten Proben durchgeführt.

Bei der *Gefriersubstitution* hingegen wird das gefrorene Wasser der Probe durch ein flüssiges Polymer substituiert und dieses dann auspolymerisiert. Das ist natürlich ein invasiver Vorgang, der die Gefahr der Veränderung des Hydratationszustandes sowie der Umorganisation und/oder Auswaschung von Molekülen mit einem Gewicht unter 1000 Da in sich birgt. Zudem ist es ein sehr zeitaufwendiges Verfahren (Dauer: circa 1 Woche). Im Rahmen dieser Arbeit wurden gefriersubstituierte Proben ausschließlich für ergänzende Ultrastrukturuntersuchungen herangezogen – nicht aber zu Untersuchungen des Hydrata-

* zudem dauert sie so lange, daß chemische und osmotische Veränderungen innerhalb der Probe auftreten können [55], [56].

† Insbesondere darf sich das in der Probe enthaltene gefrorene Eis nicht umkristallisieren, was bei Temperaturen oberhalb der Rekristallisationstemperatur von -110°C der Fall wäre.

tionszustandes. Allerdings liegt die Probe schließlich fest in einem Kunststoffblock vor und ist damit für praktisch unbegrenzte Zeit bei Raumtemperatur haltbar, weiterverarbeitbar und mikroskopierbar. Auf die Einzelheiten wird in Abschnitt 2.3.4 ab Seite 38 eingegangen.

2.3.1 Theoretische Grundlagen

Wasser ist Grundvoraussetzung des Lebens auf der Erde und daher in allen biologischen Strukturen ubiquitär. Vom physikalischen Standpunkt hat es viele außergewöhnliche Eigenschaften, die es auch aus diesem Blickwinkel einzigartig machen. Diese Eigenschaften bewirken einerseits Artefakte beim Einfrieren von biologischen Proben, andererseits aber auch die Möglichkeit, genau diese Artefakte zu vermeiden. Daher sollen im folgenden zunächst die in diesem Zusammenhang wichtigen physikalischen Charakteristika von Wasser und Eis vorgestellt werden und danach (Abschnitt 2.3.2 ab Seite 30) die Gefriertechniken, die darauf aufbauen.

Eigenschaften von Wasser und Eis

Vergleicht man die Siedepunkte der Wasserstoffverbindungen der 4., 5., 6. und 7. ten chemischen Hauptgruppe miteinander, so fällt auf, daß sich H_2O , HF und NH_3 durch ungewöhnlich hohe Siedepunkte auszeichnen.* Das bedeutet, daß die intermolekularen Anziehungskräfte dieser Verbindungen ungewöhnlich stark sind. Neben den LONDONSchen Kräften (die zwischen den momentanen, fluktuierenden Dipolen der Elektronenwolken benachbarter Moleküle entstehen) treten bei Ihnen auch starke Wasserstoffbrücken auf, während sie bei den anderen Verbindungen praktisch unbedeutend sind.

Durch die im Vergleich zum Sauerstoff höhere Elektronegativität beim Fluor sind zwar die Wasserstoffbrücken im Fluorwasserstoff circa 50 % stärker als beim Wasser. Weil im Wassermolekül aber zwei Wasserstoffatome gebunden sind, können auch zwei Wasserstoffbrücken pro Molekül aufgebaut werden, sodaß sich beim Wasser netto stärkere intermolekulare Anziehungskräfte ausbilden als beim Fluorwasserstoff.

Gefriert flüssiges Wasser, so bildet jedes Molekül in tetraedischer Anordnung vier Wasserstoffbrücken zu benachbarten Wassermolekülen aus. Die sich daraus ergebenden Hohlräume bewirken, daß Eis eine geringere Dichte hat als Wasser – oder anders ausgedrückt, daß sich Wasser beim Gefrieren ausdehnt, wodurch gefrorenes Wasser (Eis) auf der Flüssigphase (Wasser) aufschwimmt; dies ist eine der sogenannten "Anomalien des Wassers".

Zudem friert Wasser bevorzugt monokristallin. Organische und anorganische Moleküle werden von den wachsenden Eiskristallen verdrängt. Im biologischen Gewebe kommt es daher zu einer Umorganisation und Kompression der Biomatrix an die Korngrenzen des Eiskristalls. Entfernt man das Wasser, so bleibt dieses zusammengesobene Material als charakteristische aufgelockerte Struktur – das sogenannte *Segregationsmuster* – zurück (als Beispiel siehe Abbildung 4.12a auf Seite 75). Die Größe der entstandenen Hohlräume spiegelt sowohl den Gehalt an Wasser als auch dessen Freiheitsgrad in der ursprünglichen

* Neben hohen Siedepunkten zeigen diese Verbindungen auch abnorm hohe Schmelzpunkte, Verdampfungsenthalpien, Schmelzenthalpien und Viskositäten.

Struktur und die lokale Kühlrate wieder. Patrick Echlin [53] gibt einen guten Überblick über dieses Themengebiet.

Die beschriebenen Artefakte sind umso bedeutender, da Wasser überall in der Biologie ein integraler Strukturbestandteil ist. Friert man allerdings mit hoher Kühlrate ein, so bleibt den Wassermolekülen zu wenig Zeit, um sich in die energetisch günstigste Position zu bewegen und zusammenzulagern. Nur dann erstarrt Wasser in einer glasartigen, amorphen Phase, die nicht von einer Volumenvergrößerung begleitet wird. Beim Einfrieren von großen Volumina kommt erschwerend hinzu, daß bereits gefrorene äußere Schichten als Thermoisolation für die Wärmeabfuhr von innen nach außen wirken, sodaß es sehr schwer ist, eine massive Probe vollständig amorph zu frieren.

Unterkühlbarkeit von Wasser Allgemein wird angenommen, daß Wasser bei 0°C zu Eis gefriert. Das muß nicht immer der Fall sein, denn dies ist nur die Temperatur, bei der Eis schmilzt (die Schmelztemperatur T_M). Beim Gefrieren verhält es sich aus thermodynamischen Gründen jedoch anders: Durch die BROWNSche Molekularbewegung lagern sich immer wieder Wassermoleküle spontan zu geordneten Agglomeraten (sogenannten Clustern) zusammen. Dies ist eine weitere Anomalie des Wassers, denn erst ab Temperaturen oberhalb von circa 60°C weisen alle Wassermoleküle die volle Bewegungsfreiheit einer Flüssigkeit ohne Bildung von Clustern auf. Normalerweise zerfallen sie aber ebenso schnell wie sie gebildet werden. Erst wenn sich ausreichend viele Moleküle zusammengelagert haben, entsteht ein stabiler Kristallisationskeim, an dem weiteres Kristallwachstum erfolgen kann*. Dieses spontane Zusammenlagern von Wassermolekülen zu Kristallisationskeimen, an denen nachfolgend ein Kristallwachstum stattfindet, nennt man "Nukleation". Sind dabei nur Wassermoleküle beteiligt, so spricht man von "homogener Nukleation". Als Nukleationskeime können aber auch Ionen oder Fremdstoffe (beispielsweise Kontaminationen oder Gefäßwände) wirken ("heterogene Nukleation")†. Reines Wasser kann bei Normaldruck bis -38°C abgekühlt (unterkühlt) werden, ohne daß es friert; durch Zugabe geringster Mengen von Salzen kommt es schon bei höheren Temperaturen zum Gefrieren‡. Die Unterkühlbarkeit von Wasser ist zudem druckabhängig; dieser Effekt wird beim Hochdruckgefrieren zur Verbesserung der Einfrierresultate verwendet.

Modifikationen von Eis bei Normaldruck

Hexagonales Eis Wird den einzelnen Wassermolekülen beim Frieren ausreichend Zeit gegeben, sich zu organisieren, bilden sie eine hexagonale Kristallstruktur aus, die mindestens in einem Temperaturbereich von 0°C bis circa -196°C (Siedepunkt von Stickstoff)

* bei -5°C sind etwa 45.000 Wassermoleküle nötig, bei -40°C reichen bereits 70 Moleküle für einen stabilen Keim [62].

† Diese ist in der Alltagswelt wesentlich häufiger. So haben beispielsweise Meteorologen gezeigt, daß sich in Hagelkörnern und Schneeflocken stets ein Fremdpartikel befindet, der als Kristallisationskeim wirkte.

‡ Mit Silberjodid beispielsweise schon bei -7°C ; es wird daher von Flugzeugen aus eingesetzt, um das Abregnen von Wolken zu initiieren.

stabil ist. Daher hat auch das gefrorene Wasser aus der "Alltagserfahrung" (Schnee und Eis, vergleiche Abbildung 2.14) hexagonale Symmetrie.

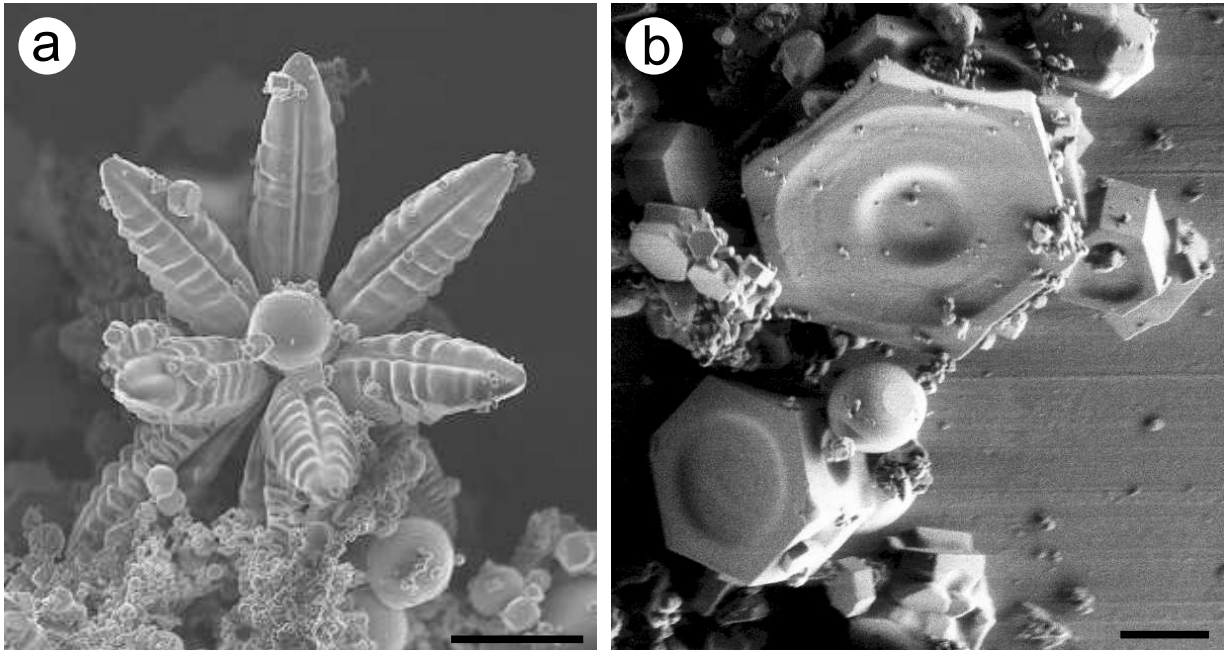


Abbildung 2.14: Gewachsenes Eis, das in hexagonaler Symmetrie auskristallisiert ist. Maßbalken: 3 μm . (Abbildung (a) mit freundlicher Genehmigung von Stefan Wiesner)

Kubisches Eis Kubisches Eis entsteht typischerweise durch Rekristallisation von amorphem Eis durch Erwärmung über -110°C und ist auf direktem Wege nur schwer darzustellen. Kubisches Eis ist bei Temperaturen unter -73°C stabil.

Amorphes Eis Durch Vakuumkondensation auf kalten Flächen mit Temperaturen unter -130°C oder durch ein ausreichend schnelles Abkühlen von flüssigem Wasser kann es in einen Zustand versetzt werden, in dem die einzelnen Wassermoleküle keinerlei Fernordnung besitzen (sich somit in einem nicht-kristallinen Zustand befinden), sie aber praktisch keine Beweglichkeit mehr haben. Ähnlich wie Glas erstarrt also das Wasser mehr als daß es gefriert und bleibt somit als Flüssigkeit erhalten – zeigt daher insbesondere keine Volumenvergrößerung. Amorphes Eis ist nur unterhalb von etwa -130°C stabil. Bei höheren Temperaturen wandelt es sich kontinuierlich in kubisches und/oder hexagonales Eis um und vergrößert dabei sein Volumen.

Herstellen läßt sich amorphes Eis durch Abkühlen von flüssigem Wasser. Kritisch ist dabei stets der Temperaturbereich, bei dem die Wassermoleküle beginnen, sich lokal zu Kristallen zusammenzulagern. Will man größere Eiskristalle vermeiden, so muß dieser kritische

Bereich ausreichend schnell durchlaufen werden (das heißt man braucht eine entsprechend hohe Kühlrate*) und die Probe darf nicht zu dick sein, weil sonst beim Gefrieren die äußeren Schichten als thermischer Isolator wirken.

Eine alternative Methode, um Wasser (und hydratisierte Strukturen) amorph einzufrieren ist das Hochdruckgefrieren. Neben einer Kühlung wird dabei zusätzlich hoher Druck appliziert.

Freies und strukturell gebundenes Wasser

Grundsätzlich kann Wasser im biologischen Gewebe drei Funktionen haben: Einerseits kann es ein wesentlicher Bestandteil der 3D-Struktur sein, beispielsweise in Proteinen oder der DNA. Dort ist es dann meist stark gebunden (*Strukturwasser*) und eine Entfernung führt zur Umorganisation der Struktur. Ferner gibt es das *gebundene Wasser*, das mit Strukturen assoziiert ist und diese wie eine Hülle umgibt (es heißt daher auch Hydrat- oder Hüllwasser) und eine höhere Beweglichkeit als das Strukturwasser hat. Schließlich gibt es das (*quasi*) *freie Wasser*, das kaum oder gar nicht gebunden ist, weil es andere Aufgaben, wie beispielsweise Transport (zum Beispiel Blut) oder Speicherung (Vakuole in Pflanzenzellen) erfüllt. Es hat eine praktisch unverminderte Beweglichkeit und kann sich daher im Gegensatz zu den beiden ersten Fällen beim Gefrieren praktisch frei organisieren, um Wasserkristalle zu bilden. Wenn im folgenden von Wasser in biologischen Geweben die Rede ist, das sich durch Gefrieren ausdehnt, so ist damit das freie Wasser gemeint.

2.3.2 Gefrier-Techniken

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Proben mittels Plunge-Gefrierens und mittels Hochdruckgefrierens fixiert. Beide haben spezifische Vor- und Nachteile (siehe die beiden folgenden Kapitel) und wurden entsprechend der Fragestellung eingesetzt. Gemeinsam ist ihnen, daß durch ein optimiertes Verfahren das (freie) Wasser in der Probe beim Herunterkühlen möglichst nicht auskristallisiert (das heißt "gefriert" in der eigentlichen Wortbedeutung, die den Übergang vom flüssigen zum festen Aggregatzustand bezeichnet), sondern ohne Volumenvergrößerung im amorphen Zustand erstarrt. Dies wird beim Hochdruckgefrieren für Proben bis zu einer bestimmten Größe (Durchmesser bis 2 mm, Dicke bis 200 µm) erreicht. Beim Plungegefrieren hingegen bestehen praktisch keine Größeneinschränkungen, allerdings ist die Gefrierqualität auch geringer. Kritisch sind beim Abkühlen immer solche Temperaturbereiche, in denen durch Umkristallisation kristallines Eis entsteht. Sind diese durchlaufen, kann amorphes Wasser bei Temperaturen unter -130°C stabil gehalten werden.

Das Plunge-Gefrieren

Beim Plungegefrieren wird die Probe mit hoher Geschwindigkeit (um 7 m/s) in das Kältemittel (flüssiger Stickstoff oder flüssiges Ethan) bewegt und so gefroren. Es strömt dabei

* für 100 nm dicke Wasserfilme reicht eine Kühlrate von 12.000 K/s

während der kritischen Abkühlphase kontinuierlich an der Probenoberfläche vorbei, wodurch der Wärmeentzug maximiert wird. Dabei ist darauf zu achten, daß die zu fixierenden Strukturen als erstes Kontakt mit dem Kältemittel haben.

Flüssiger Stickstoff ist dabei allerdings relativ ungeeignet, weil er sich bei Atmosphärendruck am Siedepunkt von circa -196°C befindet und daher ausgeprägt das sogenannte LEIDENFROSTsche Phänomen zeigt. Wird ein warmer Körper in flüssigen Stickstoff eingetaucht, so bildet sich spontan eine Dampfschicht rund um diesen Körper, der einen Wärmetransfer stark verlangsamt.* Zur Anwendung kommt daher flüssiges Ethan, das dieses Phänomen weniger zeigt, da es durch Kühlung mittels flüssigen Stickstoffs weit unterhalb des Siedepunktes gehalten werden kann und daher den Proben so effizienter die Wärme entzieht†.

Der Vorteil dieser Technik ist, daß sie bezüglich Aufbau und praktischer Durchführung sehr einfach ist. Allerdings können so nur dünne Proben völlig artefaktfrei präpariert werden, denn zuerst wird die äußerste Schicht gefroren, die dadurch bei dickeren Proben thermisch isolierend wirkt, sodaß den inneren Bereichen dann immer schlechter die Wärme entzogen werden kann und diese immer schlechter gefroren werden. Alles unterhalb der äußersten $5\ \mu\text{m}$ - $10\ \mu\text{m}$ (bei lebenden Strukturen) zeigt starke Schäden durch Eiskristallwachstum. Das läßt sich auch nicht durch andere Präparationsparameter (zum Beispiel schnellere Eintauchgeschwindigkeit in das Kühlmittel oder andere Kühlmittel) wesentlich verbessern.

Das Hochdruckgefrieren

Beim Hochdruckgefrieren wird davon Gebrauch gemacht, daß sich die Unterkühlbarkeit von flüssigem Wasser mit dem Umgebungsdruck stark ändert. Im Wesentlichen wird die Probe – ausgehend von Atmosphärendruck – zunächst kurzzeitig ungefähr $2,2 \cdot 10^8\ \text{Pa}$ ausgesetzt. Für reines Wasser sinkt dadurch die Schmelztemperatur T_M von 0°C auf -22°C und anstatt bis -38°C ist es bis -92°C ohne Kristallisation unterkühlbar (vergleiche Abbildung 2.15 auf der nächsten Seite). Spätestens bei dieser Temperatur setzt durch homogene Nukleation die Kristallbildung ein. Jede weitere Abkühlung führt unweigerlich durch einen kritischen Temperaturbereich, der von der Temperatur, bei der Kristallisation einsetzt bis zu den -130°C reicht, bei der amorph gefrorenes Wasser metastabil ist. Um größere Eiskristalle zu vermeiden, sollte dieser Temperaturbereich schnell durchlaufen und/oder möglichst klein werden. Bei einem Druck von $2,2 \cdot 10^8\ \text{Pa}$ sind dies minimal 40 K. Zudem ist durch den hohen Druck die Viskosität des Wassers gegenüber Normaldruck deutlich erhöht, sodaß die Wassermoleküle weniger beweglich sind und ihre Zusammenlagerung behindert wird. Daher reichen vergleichsweise geringe Kühlraten von ungefähr $3.000\ \text{K/s}$ aus, ohne daß es zur Bildung von makroskopischen Eiskristallen kommt.

Bei Normaldruck ist reines Wasser nur bis -38°C unterkühlbar, sodaß es über einen Temperaturbereich von minimal 90 K mit der Gefahr der Eiskristallbildung abgekühlt werden muß. Neben diesem wesentlich größeren Temperaturbereich bleibt die Viskosität des Was-

* auch Wasser zeigt dieses Phänomen, wie man an Wassertropfen sehen kann, die auf einem Dampfkeissen schwebend auf der heißen Herdplatte tanzen.

† ungefähre Kühlraten: flüssiger Stickstoff: $250\ \text{K/s}$; flüssiges Ethan: $12.500\ \text{K/s}$.

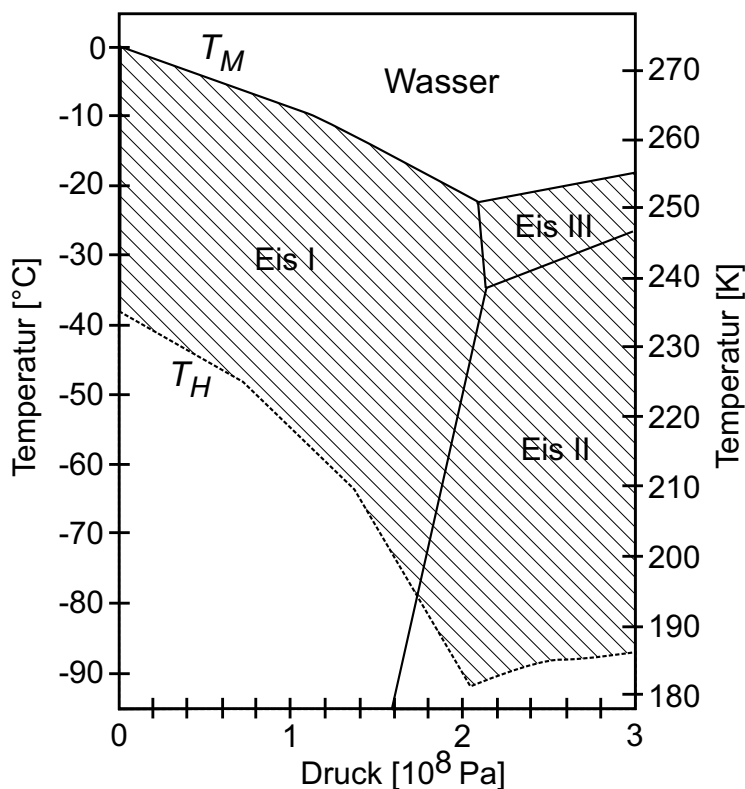


Abbildung 2.15: Phasendiagramm von Wasser : Beim Abkühlen von flüssigem Wasser kann es bei Unterschreiten der Schmelzkurve T_M zu einer heterogenen Nukleation kommen. Je nach seiner Reinheit kann das Wasser auch bis zum Einsetzen der homogenen Nukleation (T_H) – also im schraffierten Gebiet – unterkühlt werden. Abhängig von Druck und Temperatur sind verschiedene Kristallformen des Eises stabil (Eis I bis III, wobei Eis I kubisches oder hexagonales Eis ist). Oberhalb der Schmelzkurve T_M liegt in jedem Fall das Wasser in flüssiger Form vor.

(Abbildung nach [63])

sers praktisch unvermindert.

Wie sich das Wasser im biologischen Gewebe insbesondere in Bezug auf seine Unterkühlbarkeit verhält, ist schwer abzuschätzen. In seiner Zusammensetzung enthält das Gewebewasser verschiedene Salze, Proteine und Aminosäuren, die beim Gefrieren als Nukleationskeime bilden können; gleichzeitig kann es an diese Strukturen in Form einer Hydrathülle gebunden werden. In tierischen Zellen ist der Innenraum zudem meist hoch organisiert mit verschiedenen Makromolekülen und Zellorganellen. Untersuchungen bestätigen, daß nur ein kleiner Teil des interzellulären Wassers seine volle Beweglichkeit hat [64]. Tendenziell ist daher mit einer deutlichen Unterkühlbarkeit zu rechnen.

Praktische Verwirklichung Zuerst realisiert wurde die Hochdruckgefrieretechnik von Moor und Riehle 1968 [65]. Kommerziell erhältlich ist beispielsweise das HPM010 von

Bal-Tec [66] das im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Die Probe wird dabei wie in einem Sandwich zwischen zwei Gold- oder Aluminiumprobenhalter gelegt. Dabei ist wichtig, daß eventuelle luftgefüllte Zwischenräume mit einem inerten, inkompressiblen Medium ausgefüllt werden, denn sonst würde beim Anlegen des Drucks nur die Luft komprimiert werden, nicht aber die Probe. Im Allgemeinen wird hierfür Hexadeken verwendet. Eingeschraubt in einen Halter wird dieses Probensandwich in die Probenkammer genau zwischen gegenüberliegenden Öffnungen eingesetzt, durch die später das Kühlmittel (flüssiger Stickstoff) eingeschossen wird. Durch einen Kompressor wird im Niederdruckteil der Anlage Öl auf einen Druck von $3 \cdot 10^7$ Pa gebracht. Auf Knopfdruck entspannt sich dieser Druck über einen speziell geformten Kolben, der flüssigen Stickstoff auf einen wesentlich höheren Druck komprimiert. Die Probenkammer wird daraufhin mit Alkohol geflutet, welcher nach circa 15 ms durch den einschießenden Stickstoff verdrängt wird. Die dadurch eintretende Verzögerung bewirkt, daß erst mit einem Druck nahe bei den optimalen $2,2 \cdot 10^8$ Pa der Stickstoff auf die Probe trifft, diese unter Druck setzt und gleichzeitig abkühlt.

Mögliche Auswirkungen des angelegten Druckes auf die Probe sind schwer abzuschätzen – insbesondere, weil er nur circa 1 s anliegt. Die höchsten Drücke oberhalb von $1,8 \cdot 10^8$ Pa liegen kürzer als 500 ms an. Untersuchungen an Einzellern zeigen, daß neben dem Druck auch dessen Haltezeit wesentlich für mögliche Schädigungen ist. Moor und Höchli untersuchten dies am Beispiel von *Euglena* Zellen bei einem Druck von $2 \cdot 10^8$ Pa. Bei einer Druckdauer von 100 ms überlebten 90 % der Zellen; bei 2 s waren alle Zellen tot. Dies wird beispielsweise bei der Hochdruck-Sterilisation benutzt, bei der solche Drücke über mehrere Minuten angelegt werden (vergleiche Kapitel 17 in [62]). Welche Auswirkungen ein für wenige Millisekunden extern angelegter hoher Druck auf komplexe biologische Gewebe wie beispielsweise die Haut hat, wurde allerdings bisher noch nicht untersucht.

Möglichkeiten und Grenzen Das Hochdruckgefrieren ist heutzutage das einzige Verfahren, das es ermöglicht, Biopsien und Gewebeproben mit einem Durchmesser von 2 mm und einer Dicke von bis zu 200 μm artefaktfrei zu fixieren [67], [68], [69]. Allerdings ist es ein sehr aufwendiges und zeitintensives Verfahren, dessen Gefrierqualität zudem im realen Einsatz stark schwankt. Allgemein wird heute das Hochdruckgefrieren als beste Gefrier-technik erachtet, wenn es darum geht, schnelle biologische Vorgänge zu arretieren und dabei gleichzeitig die Nanoorganisation zu erhalten.

2.3.3 Cryo-Präparation

Durch die Cryopräparation werden Teile der Probe weggeschnitten und so innere Zell- und Gewebestrukturen der Probe freigelegt. Die gebräuchlichsten Techniken sind der Gefrierbruch und die Cryo(Ultra)Mikrotomie. Ein Gefrierbruch wird vorzugsweise bei tiefen Temperaturen im Vakuum durchgeführt. Mittels einer (ebenfalls gekühlten) Metallklinge wird mechanisch Kraft auf die Probe ausgeübt. Sie wird jedoch allenfalls lokal wirklich geschnitten; großflächig bricht sie an den statistisch schwächsten Bereichen auf*. Die

* gefrorenes biologisches Material bricht beispielsweise bevorzugt entlang von Membranen.

Bruchflächen haben daher verschiedene geometrische Orientierungen, die in ihrer Entstehung wenig vom Experimentator beeinflussbar sind (Abbildung 2.16a). Man erhält zwar

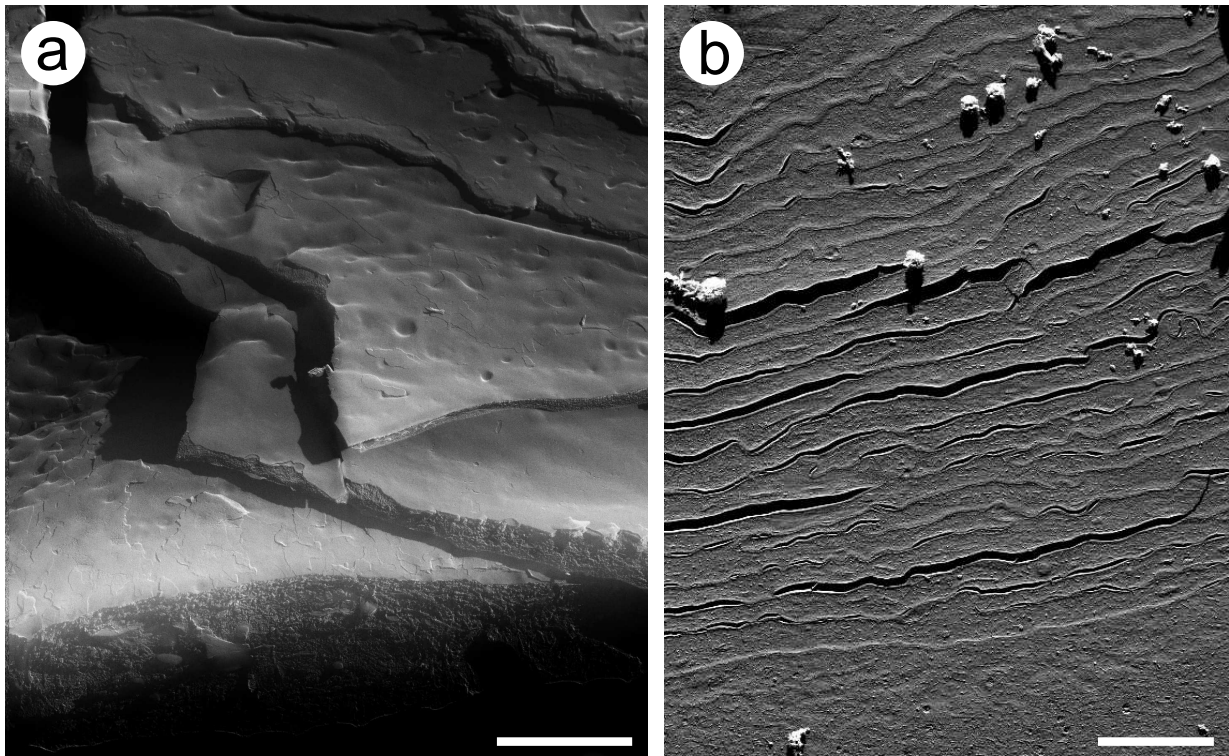


Abbildung 2.16: Durch Gefrierbruch (a) und Cryo-Ultramikrotomie (b) präpariertes Stratum Corneum. Maßbalken: jeweils 3 μm . (Abbildung (a) mit freundlicher Genehmigung von Roger Wepf)

so einen guten Eindruck von der dreidimensionalen inneren Struktur, allerdings sind beispielsweise Dickenbestimmungen einzelner Zellen meist nicht möglich. Ein Vorteil dieser Technik ist, daß sie vollständig im Vakuum durchgeführt werden kann, sodaß es zu keiner Kontamination der frischen Bruchfläche kommt (sofern sie durch kalte Flächen in der Nähe vor Wasser-Resublimation geschützt ist).

Cryo-Ultramikrotomie

Das Prinzip der *Cryo-Ultramikrotomie* ist dem des Gefrierbruches ähnlich: Auch hier wird auf die gefrorene Probe mittels eines gekühlten Messers Kraft ausgeübt. Allerdings bewirkt eine wesentlich präzisere mechanische Führung und insbesondere eine wesentlich höhere Qualität des Messers (je nach Anwendungsfall werden auch Diamantmesser eingesetzt) ein wirkliches Schneiden der Probe. Schnitttrichtung und -tiefe kann dabei von dem Experimentator frei vorgegeben werden. Insbesondere lassen sich so homogene Querschnitte wie auch Dünnschnitte von Biostrukturen anfertigen (siehe Abbildung 2.16b). Der Schneidevorgang

findet in einer gekühlten Atmosphäre aus gasförmigem Stickstoff statt, der die Probe vor Kontamination mit Luftfeuchtigkeit schützt. Die Temperatur von Schneidmesser, Probe und Atmosphäre können unabhängig voneinander eingestellt werden. Durch das Schneiden entstehen im Gewebe unabgesättigte Ladungen, die attraktiv auf Kontaminationen (insbesondere Wasser/Eis) wirken. Dem kann man entgegenwirken, indem man die Atmosphäre in der Nähe der Schnittfläche ionisiert, sodaß sich die Ladungen darauf neutralisieren können.

Gefrierätzung

Meist kann eine Kontamination der präparierten Oberfläche nur vermindert aber nicht gänzlich verhindert werden. Eine Möglichkeit, im Vakuum gezielt Eis wieder zu entfernen, ist die Gefrierätzung, die ihre Grundlage in dem Masseaustausch zwischen der Eisoberfläche und der sie umgebenden Wasserdampf-atmosphäre hat: Pro Zeiteinheit resublimiert eine bestimmte Anzahl von Wassermolekülen auf der Oberfläche und andererseits sublimieren auch Moleküle von dort in die Atmosphäre. Im Gleichgewicht bildet sich ein zeitlich konstanter Wasserdampfdruck aus, der allgemein "Sättigungsdampfdruck" genannt wird. Er ist stark temperaturabhängig (siehe Abbildung 2.17 auf der nächsten Seite). Wird für eine feste Temperatur der externe Wasserdampfdruck über diesen Sättigungsdampfdruck erhöht, so überwiegt die Resublimation und es schlägt sich Eis auf der Oberfläche nieder. Dies ist bekanntermaßen bei Cryoproben der Fall, die Kontakt mit Umgebungs-atmosphäre und der darin enthaltenen Luftfeuchtigkeit bekommen*. Findet folglich eine Probenpräparation nicht vollständig im Vakuum statt, dann besteht immer die Gefahr einer Kontamination mit Wasser, die insbesondere für oberflächensensitive Mikroskopieverfahren wie die Rasterelektronenmikroskopie ein Problem darstellt. Nun kann man das Wissen um den Gleichgewichtsdruck auch nutzen, um Eis von der Oberfläche wieder zu entfernen: Wird der Druck nämlich unter den Sättigungsdampfdruck abgesenkt (beispielsweise in einer Hochvakuumanlage), überwiegt die Sublimation. Gemäß Umrath [71] gilt dann für die Sublimationsrate m bei der Temperatur T , Wasserdampfpartialdruck p und Sättigungsdampfdruck p_S :

$$m \propto [p_S(T) - p] \cdot \sqrt{\frac{1}{T}} \quad (\text{für } p_S \geq p)$$

bei konstanter Temperatur ergibt sich daraus:

$$m = m_{max} \cdot \left(1 - \frac{p}{p_S}\right) \tag{2.11}$$

Durch Vorgabe der Probentemperatur kann folglich innerhalb einer Hochvakuumanlage bestimmt werden, ob Wasser von der Oberfläche sublimiert und mit welcher Rate. An einem Zahlenbeispiel soll das verdeutlicht werden: Die Eisoberfläche befinde sich in einer

* bei $-160\text{ }^\circ\text{C}$ ist für Wasser der Sättigungsdampfdruck $8 \cdot 10^{-12}$ Pa bei einem Umgebungsdruck von $1 \cdot 10^5$ Pa.

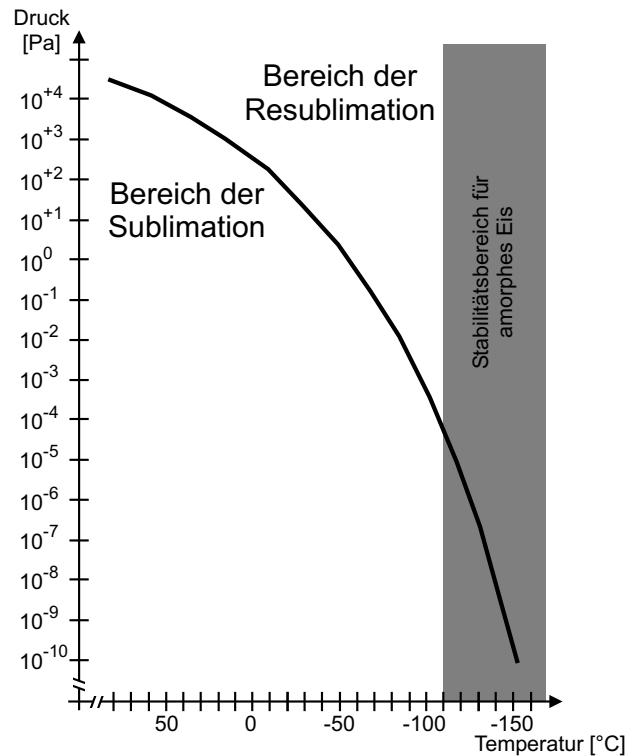


Abbildung 2.17: Sättigungsdruck $p_S(T)$ von Eis in Abhängigkeit von der Temperatur: Wird der Druck extern über diesen Sättigungsdruck erhöht, so kommt es zur Resublimation, bei Absenkung darunter zu einer Sublimation von Eis. Grau unterlegt ist der Temperaturbereich, in dem amorphes Eis stabil gegen Umkristallisation ist.

(Abbildung nach [70])

Hochvakuumanlage mit einem Druck von 10^{-5} Pa. Dann findet bei Temperaturen oberhalb von circa -120°C eine Sublimation statt (vergleiche Tabelle 2.1 auf der folgenden Seite). Bei Temperaturen über -100°C ist bereits $p_S \gg p$ und damit $m \approx m_{max}$, sodaß dann nur noch die Temperaturabhängigkeit von m_{max} die Sublimationsrate bestimmt. 10 nm Eis werden dann bei -120°C innerhalb von $5,02 \cdot 10^2 \text{ s} = 8,37$ Minuten entfernt, bei -60°C aber bereits in 6,76 ms.

Auch hydratisierte biologische Proben können auf diese Weise bei tiefen Temperaturen entweder vollständig getrocknet werden (*Gefriertrocknung*) oder kontrolliert Wasser von ihrer Oberfläche entfernt werden (*Gefrierätzung*). Der Vorteil des Arbeitens bei tiefen Temperaturen liegt darin, daß Gefrierartefakte durch Rekrystallisation vermieden oder vermindert werden können.

Im Gegensatz zu einer reinen Eisfläche bildet sich in biologischen Proben bei fortwährender Sublimation eine wachsende Schicht aus getrocknetem Material an der Außenseite, die als Diffusionsbarriere für die sublimierenden Wassermoleküle wirkt. Die Sublimationsrate m wird daher mit zunehmender Trockenschicht d_{Tr} abnehmen. In Anlehnung an das erste

T [°C]	p_S [Pa]	m_{max} $\left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}\right]$	m $\left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}\right]$	$t_{10\text{nm}}$ [s]
-60	$1,08 \cdot 10^0$	$1,37 \cdot 10^{-3}$	$1,37 \cdot 10^{-3}$	$6,76 \cdot 10^{-3}$
-100	$1,32 \cdot 10^{-3}$	$1,87 \cdot 10^{-6}$	$1,86 \cdot 10^{-6}$	$4,99 \cdot 10^0$
-120	$1,24 \cdot 10^{-5}$	$1,86 \cdot 10^{-8}$	$3,60 \cdot 10^{-9}$	$5,02 \cdot 10^{+2}$

Tabelle 2.1: Sublimationsraten von Eis bei verschiedenen Temperaturen sowie die benötigte Zeit, um 10 nm Eis von der Oberfläche zu entfernen ($t_{10\text{nm}}$). Der externe Wasserdampfpartialdruck beträgt $p = 1 \cdot 10^{-5}$ Pa. Zahlenwerte aus [71] zusammen mit Gleichung 2.11.

FICKSche Gesetz wird vielfach eine reziproke Abhängigkeit angesetzt:

$$m \propto \frac{1}{d_{\text{Tr}}}$$

Es gibt allerdings auch experimentelle Ergebnisse, die einen exponentiellen Zusammenhang nahelegen [72][73]:

$$m \propto e^{-d_{\text{Tr}} \cdot k}$$

Für 1 mm dicke Proben von Meerschweinchenleber bestimmte Stephenson [74] Trocknungszeiten, die konstant um einen Faktor von circa $1,3 \cdot 10^3$ höher lagen als für reines Eis erwartet. Bishop [75] hingegen schätzt diesen Faktor nur auf 3 bis 6.

Bei einer vollständigen Gefriertrocknung ist der Einfluß der Trockenschicht bedeutend größer als bei einer Gefrierätzung, die nur wenige Nanometer Eis von der Oberfläche entfernt. Weiterhin können die Wassermoleküle auch wesentlich stärker an den biologischen Strukturen gebunden sein als in einem Verband aus reinem Eis.

Die diskutierten Sublimationsraten stellen somit die maximal mögliche Rate dar. Sie ist stark temperaturabhängig, sodaß Gefrierätzungen oder -trocknungen bei Temperaturen unter -120°C für den praktischen Einsatz viel zu langsam ablaufen (Tabelle 2.1). Die im realen Versuch erreichbaren Raten werden von dem genauen Probenmaterial wie auch dessen geometrischen Form abhängen und schwer vorhersagbar sein. Nur durch genaue Vorgabe der Proben temperatur und des Druckes sowie einer Kontrolle des Sublimationsfortganges im Elektronenmikroskop können die optimalen Parameter gefunden werden.

Elektronenstrahlbedampfung

Meist wird bei der Rasterelektronenmikroskopie die präparierte Probe noch mit anderen Elementen bedampft. Benutzt werden dafür unter anderem Elektronenstrahlverdampfer, bei denen ein Elektronenstrahl auf ein chemisches Element (beispielsweise Kohlenstoff oder Metalle) gerichtet wird und dieses verdampft. Einzelne Atome oder kleine Atomcluster setzen sich dann auf der Probe ab. Motivation für die Bedampfung ist eine Steigerung des Topographiekontrastes oder der Auflösung: Werden nämlich Schwermetalle (zum Beispiel Wolfram oder Platin) bei Raumtemperatur oder darunter aufgedampft, bilden sie auf der

Oberfläche meist isolierte Inseln oder Kügelchen*, die wesentlich stärker mit dem Primärelektronenstrahl wechselwirken (und damit auch wesentlich mehr Rückstreuelektronen erzeugen) als das biologische Gewebe der Probe darunter. Sind die Metallinseln isoliert und haben somit keinen elektrischen Kontakt miteinander, so wirken sie quasi als Punktstrahler und bestimmen die Auflösung allein durch ihre laterale Ausdehnungen (dies nennt sich *Partikelkontrast*). Praktisch wird dies in der sogenannten *Pseudo Replika Technik*[†] (englisch: "double layer shadowing") [76] verwendet: Zunächst erfolgt eine Bedampfung der Oberfläche mit einem (Schwer)Metall unter einem bestimmten Winkel ("Elevationswinkel" genannt, vergleiche Abbildung 2.18 auf der folgenden Seite). Er bestimmt wesentlich die Homogenität und Topographieabhängigkeit der Bedampfung, denn je flacher er ist, umso größer der Schattenwurf, das heißt die Bereiche, in die kein Schwermetall hingelangt und damit im Elektronenstrahl kaum Rückstreuelektronen erzeugen. Insgesamt erhöht dies zwar den Kontrast in den Bildern, allerdings erhält man von den Gebieten im Schattenbereich kaum Signal, was dann auch die reale Auflösung vermindert. Anschließend wird Kohlenstoff verdampft, wobei meistens der Einfallswinkel kontinuierlich verändert wird. Es entsteht dadurch ein nahezu homogener Kohlenstofffilm, der sowohl mechanisch stabilisiert als auch durch die durch Elektronenbeschuss entstehende Aufladung ableitet. Bei jeder der beiden Bedampfungen kann die Probe um ihre eigene Achse rotiert werden, was sich auf die Homogenität der Filme auswirkt. Ist der Kohlenstofffilm mit seiner Dicke in der Größenordnung der Austrittstiefe der Sekundärelektronen, so erhält man in den detektierten Sekundärelektronen eine Überlagerung der Einflüsse der Probe und des Filmes. Die Rückstreuelektronen hingegen, die durch Interaktion des Schwermetalls mit den Primärelektronen entstehen, werden durch ihre hohe kinetische Energie sehr wenig beeinflusst, sodaß diese Bedampfungstechnik sich besonders für die Detektion und Interpretation des Rückstreuelektronensignals eignet.

2.3.4 Gefriersubstitution

Bei einer Gefriersubstitution [77] wird bei tiefen Temperaturen das Wasser der gefrorenen Probe zunächst durch ein Lösungsmittel ersetzt (beispielsweise durch Ethanol oder Aceton bei $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$) und das gesamte biologische Material damit entwässert (vergleiche auch Abbildung 2.19 auf der folgenden Seite). Es schließt sich daran die Substitution des Lösungsmittels durch ein flüssiges Kunststoffmonomer an, das in das Gewebe diffundiert und schließlich durch Temperaturerhöhung oder UV-Licht zum Polymerisieren gebracht wird. Man erhält so einen festen Kunststoffblock mit der darin eingebetteten Probe, der anschließend bei Raumtemperatur weiterverarbeitet und mikroskopiert werden kann. Der genaue Ablauf ist probenspezifisch und wird in Abschnitt 3.3.1 ab Seite 55 detailliert

* sie bilden nur dann einen homogenen Film, wenn sie auf der Oberfläche eine hohe Beweglichkeit haben (beispielsweise wenn die Probe beheizt wird) und sich stets in der energieärmsten Konfiguration organisieren können.

† Der Name rührt daher, daß wie bei einer gewöhnlichen Replika ein Metall und Kohlenstoff auf die Oberfläche aufgedampft wird, die Probe darunter allerdings bei der Mikroskopie im Elektronenmikroskop erhalten bleibt.

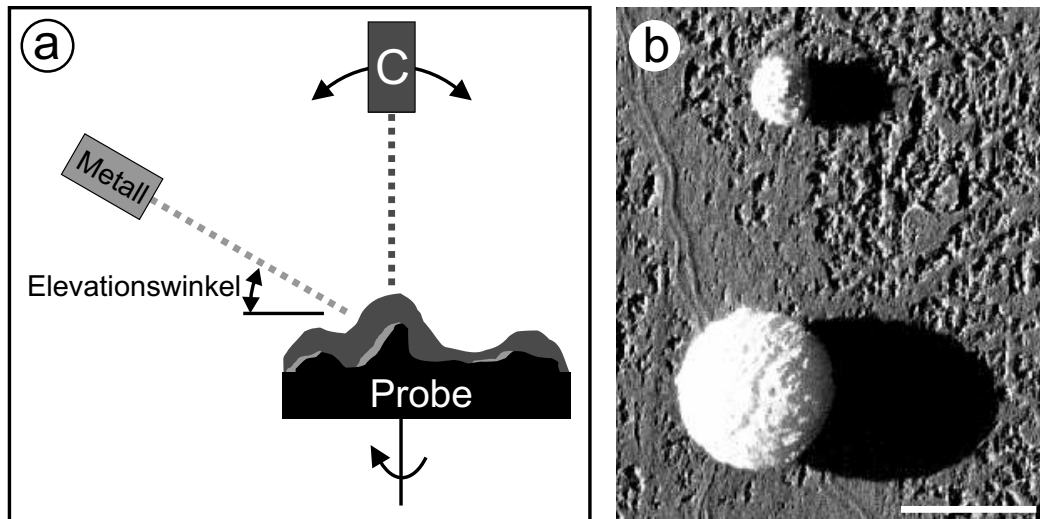


Abbildung 2.18: Pseudo Replika Technik: a) Durch die Metall- und anschließende Kohlenstoffbedampfung aus verschiedenen Winkeln ergibt sich eine inhomogene Materialverteilung auf der Probe (hellgrau: das Metall; dunkelgrau: Kohlenstoff (C)). Die Probe kann bei der Bedampfung um ihre Achse rotiert werden. b) Bei Detektion der Rückstreuelektronen erscheinen abgeschattete Bereiche, in die kein Metall hingelangt ist, dunkel. Mit Metall bedampfte Bereiche interagieren stärker mit dem Primärelektronenstrahl und generieren so ein kontrastreiches Bild der Oberfläche. Maßbalken: 1 μm .

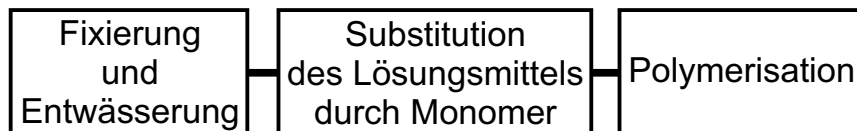


Abbildung 2.19: Übersicht über die Gefriersubstitution: Zunächst wird bei tiefen Temperaturen das biologische Material durch chemische Agenzien (beispielsweise Uranylacetat oder Osmiumtetroxid) fixiert und das Gewebewasser durch ein Lösungsmittel (beispielsweise Ethanol) ersetzt. Im nächsten Schritt wird dieses dann durch das Monomer substituiert, welches dann zum Schluß auspolymerisiert wird.

vorgestellt. Charakteristikum der Gefriersubstitution ist, daß sie bei tiefen Temperaturen abläuft, wodurch sich eine Rekristallisation des Wassers vermeiden läßt.

Den entwässernden Lösungsmitteln können Schwermetalle in reaktiven Verbindungen (beispielsweise Osmiumtetroxid oder Uranylacetat) zugesetzt werden, die sich an spezifische Strukturen anlagern und unter Ausbildung von kovalenten und/oder Ionenbindungen zusätzlich stabilisieren. Das Osmium im Osmiumtetroxid fixiert Doppelbindungen zwischen benachbarten Lipiden; hingegen binden die Uranylionen des Uranylacetat an Phosphat- und freie Carboxylgruppen und stabilisieren so die DNA und Proteine [51]. Zudem verhindert es die Auswaschung von Zellbestandteilen und Lipiden durch späteren Kontakt mit dem Monomer [78]. Werden von den so behandelten Proben Dünnschnitte im Transmissions-

elektronenmikroskop analysiert, so wirken die Schwermetallionen dort elektronenstreuend und somit kontrastverstärkend, wo sie sich angelagert haben. Osmiumtetroxid und Uranylacetat haben also gleichzeitig Fixierungs- wie auch Kontrastierungseigenschaften und werden daher auch genutzt, um den Kontrast von Dünnschnitten nach der Gefriersubstitution zu erhöhen.

Als Monomer kommt in dieser Arbeit HM20* zum Einsatz. Es gehört zur Familie der acrylat- und methacrylat-basierten Polymere, die für Tieftemperatursubstitutionen entwickelt wurden. Es ist hydrophob und verwendbar bis -70°C . Routinemäßig werden diese Lowicryle durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 360 nm polymerisiert. Möglich ist auch eine Polymerisation ohne UV-Licht bei Temperaturen über 60°C . Bei UV-Polymerisation ist darauf zu achten, daß möglichst alle Teile der mit Lowicrylen infiltrierten Probe ausreichend bestrahlt werden. Sie darf folglich nicht zu groß sein, weil sonst ihre inneren Teile abgeschattet wären. Auch ein Zusatz von Osmiumtetroxid kann durch die tiefschwarze Färbung die Polymerisation zusätzlich erschweren und lokal sogar verhindern.

Polymer-Dünnschnitte

Nachdem nicht interessierende Teile des Polymerblocks entfernt wurden (*Trimmen*), werden für die Untersuchung in einem Transmissionselektronenmikroskop Dünnschnitte mit einer Dicke zwischen 50 nm und 150 nm angefertigt. Um die notwendige Präzision zu erreichen, muß ein Ultramikrotom mit einem Messer aus Naturdiamant verwendet werden. Es ist Teil eines Troges, gefüllt mit destilliertem Wasser, auf dem die dünnen Schnitte des Polymerblocks samt eingebetteter Probe wegen der Oberflächenspannung schwimmen (vergleiche Abbildung 2.20). Sie werden mit kleinen Metall-Netzchen (sogenannte *Grids*)

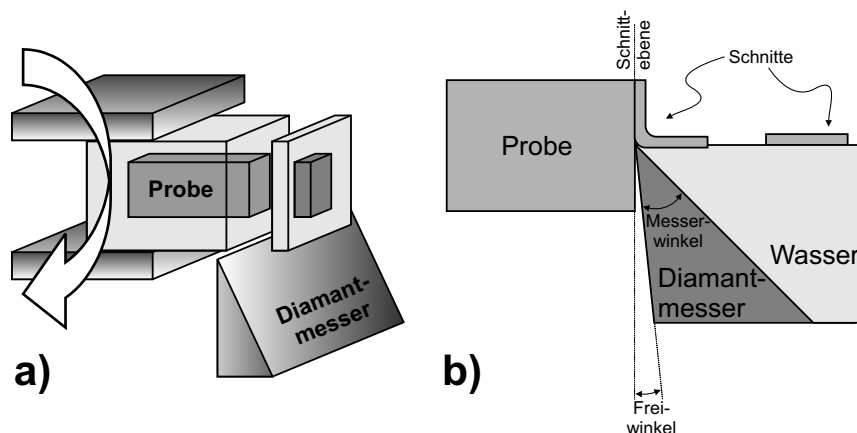


Abbildung 2.20: a) Dünnschnitte der eingebetteten Probe samt des umgebenden Polymers. b) schematische Zeichnung des Schneidevorganges in Seitenansicht. (Elemente der Zeichnungen nicht maßstabsgetreu).

aus dem Wasser abgefischt. Nach dem Verdunsten des Wassers sind die Schnitte auf dem

* mögliche Bezugsquelle: Polysciences Inc., Warrington, PA 18976, USA

Grid eingetrocknet und praktisch unlösbar mit ihm verbunden. Es schließt sich dann ggf. eine Nachkontrastierung (siehe folgendes Kapitel) an, bevor die Schnitte der Probe im Transmissionselektronenmikroskop mikroskopiert werden können.

Nachkontrastierung

Wird schon bei der Fixierung ein Schwermetall (Uran bei Verwendung von Uranylacetat oder Osmium bei Verwendung von Osmiumtetroxid) in der Probe eingelagert, kann man die angefertigten Dünnschnitte auch ohne weitere Behandlung im TEM mikroskopieren. Um die Abbildungsqualität zu steigern, werden sie allerdings meist noch mit Schwermetallsalzen nachkontrastiert. Zum Einsatz kommen ebenfalls Uranylacetat, Osmiumtetroxid oder auch Bleicitrat [79]. Auch wenn die Reaktionsmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, wird für Bleicitrat vermutet, daß sich die Bleiionen an negativ geladenen Gruppen wie beispielsweise Hydroxylgruppen anlagern. Phosphatgruppen sind möglicherweise auch daran beteiligt, weil die Verwendung von Phosphatpuffern die Gesamtkontrastierung mit Bleiionen häufig verstärkt. Einen guten Überblick über etablierte Kontrastieretechniken findet sich in [54].

Kapitel 3

Materialien und Methoden

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei wesentliche Aspekte des Stratum Corneums der humanen Haut untersucht: Einerseits das Hydratationsverhalten der einzelnen Schichten sowie Aspekte der Nanoorganisation in den Corneozyten. Daher mußte in jedem Schritt der Probenpräparation (von der Fixation bis zur finalen Abbildung im Mikroskop) sichergestellt sein, daß weder die Hydratation noch die Feinstruktur im Gewebe verändert wurde. Eine chemische Fixation schied daher aus und sämtliche Proben wurden physikalisch durch Gefrieren arretiert.

Eine **statistische Auswertung des Hydratationsverhaltens** durch Applikation verschiedener Medien machte große Proben und einen relativ hohen Probendurchsatz nötig. Daher wurden 3 mm Hautstanzen per Plungegefrieren arretiert, das inhärente Wasser aber weder entfernt noch ersetzt. Folglich mußte der gefrorene Zustand während sämtlicher Präparationsschritte bis einschließlich der Mikroskopie erhalten bleiben (möglichst bei Temperaturen unterhalb von -110°C , um eine Rekristallisation zu vermeiden). Der genaue Ablauf wird in Abschnitt 3.2 ab Seite 47 besprochen.

Um für die **Untersuchung der Nanoorganisation** den bestmöglichen Strukturerehalt zu gewährleisten, wurden dafür grundsätzlich nur hochdruckgefrorene Proben verwendet. Ihre Größe und der erreichte Durchsatz waren dadurch wesentlich kleiner. Sie wurden entweder (wie zuvor bei den plungegefrorenen Proben beschrieben) cryopräpariert oder alternativ gefriersubstituiert und dann als Dünnschnitte im Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Im letzten Fall wird allerdings potentiell der Hydratationszustand der Haut verändert; dies liefert aber auf der anderen Seite auch Aufschlüsse über die Veränderungen durch die Gefriersubstitution. Einzelheiten werden in Abschnitt 3.3 ab Seite 55 vorgestellt.

3.1 Probenvorbehandlung und Präparation

3.1.1 Das Hautmaterial

OP-Material Hauptquelle für das Hautmaterial waren Schönheitsoperationen einer kleinen Privatklinik. Es ist bekannt, daß im Vergleich zur normalen Haut das Stratum Corneum

in trockener Haut und bei Hautkrankheiten wie beispielsweise der Schuppenflechte (Psoriasis) vielfältige morphologische Veränderungen aufweist: Dies betrifft unter anderem die Anzahl und Verteilung der Desmosomen, Zusammensetzung und Organisation der interzellulären Lipide und das Cornified Envelope. Eine gute Übersicht bietet Rawlings *et al.* in [80]. Diese morphologischen Veränderungen haben sicherlich auch Auswirkungen auf das Hydratationsverhalten, sodaß für diese Arbeit sichergestellt wurde, daß nur die Haut gesunder Patienten ohne Hautkrankheiten verwendet wurde. Sie waren sämtlich weiblich und größtenteils älter als 60 Jahre. Hauptsächlich handelte es sich um Haut vom Gesicht oder der Brust, vereinzelt auch vom Ober- und Unterarm. Wie bei jedem operativen Eingriff üblich wurde die Haut desinfiziert; bei dieser Klinik mit Softasept N*. Die Anlieferung der Haut erfolgte in einer auf ca. 5–8 °C gekühlten luftdichten Transportdose. Die Haut ruhte dabei mit der Dermisseite auf Filterpapier, das mit Zellkulturmedium[†] getränkt war. So sollte sie auf dem Transport weiterhin ernährt werden, während gleichzeitig ihre Stoffwechselprozesse durch die Kühlung verringert wurden. Allerdings bewirkt dies auch, daß sich im Innern der Dose eine relative Luftfeuchtigkeit zwischen 75 % und 85 % ausbildet. In seinem Hydratationszustand gänzlich unbeeinflusstes Hautmaterial stand daher aus dieser Quelle nicht zur Verfügung. Direkt nach Eintreffen wurde die Haut entweder sofort eingefroren (um als unbehandelte Referenz zu dienen) oder mit verschiedenen Salzlösungen oder Vaseline behandelt (vergleiche Abschnitt 3.1.2).

InVivo-Biopsien Zusätzlich zu dem Hautmaterial der Schönheitsklinik wurden auch Proben vom Unterarm eines 41jährigen männlichen Probanden entnommen, dessen Haut sich im Gleichgewicht mit der Raumatmosphäre befand. Innerhalb von 3 Minuten nach Entnahme wurden die Proben mittels Hochdruckgefrierers fixiert. Durch diese sehr kurze Präparationszeit und den Einsatz einer Einfriertechnik mit bestmöglichem Strukturerehalt können diese Proben als Beispiele für den nativen und im Hydratationszustand unbeeinflussten Referenzzustand angesehen werden. Allerdings standen sie nur in sehr begrenztem Umfange zur Verfügung.

3.1.2 Hydratationsexperimente

Mit Hautmaterial von drei verschiedenen Probanden wurden insgesamt drei Hydratationsexperimente durchgeführt (vergleiche auch Tabelle 3.1 auf der folgenden Seite):

- Oberarmhaut einer 73jährigen Spenderin wurde im **Hauptexperiment** für 12 Stunden verschiedenen Salzlösungen und einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre ausgesetzt. Diese hatten sowohl Kontakt mit dem Stratum Corneum als auch mit der Seitenfläche der Hautstanze (Abbildung 3.1a auf Seite 46).

* eine alkoholische Desinfektions-Lösung. Mögliche Bezugsadresse: medi-prax Arndt GmbH, Forchachstraße 6, D-86462 Stettenhofen. Internet: <http://www.medi-prax-arndt.de/inhalt.htm>, info@medi-prax-arndt.de

† "Minimum Essential Medium Eagle" flüssiges Zellkulturmedium. Mögliche Bezugsquelle: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Eschenstraße 5, D-82024 Taufkirchen. Internet: <http://www.sigma-aldrich.com>, deorders@eurnotes.sial.com

Haupt-experiment	Kontroll-experiment	Glycerin-experiment
	<i>frisch</i>	<i>frisch</i>
<i>Feuchtekammer</i>	Feuchtekammer	Glycerin für 2 Stunden
0 % NaCl	0 % NaCl	Glycerin für 6 Stunden
5 % NaCl		
10 % NaCl		
15 % NaCl		
20 % NaCl	20 % NaCl	
	Vaseline	

Tabelle 3.1: Applizierte Medien in den Quellexperimenten: "frisch" bedeutet ohne Behandlung sofort eingefroren; "Feuchtekammer" bedeutet eine Lagerung in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre; "0 % NaCl" bedeutet die Applikation einer 0%igen NaCl-Lösung – also destilliertes Wasser - jeweils für 12 Stunden bei 5 °C. Kursiv gesetzt sind die Behandlungen, die in jedem Experiment als Referenz dienen.

- Im **Kontroll-experiment** mit Gesichtshaut einer 60jährigen Spenderin wurde die Seitenfläche der Hautstanze durch Vaseline luft- und wasserdicht versiegelt. Ein Wasseraustausch konnte somit nur noch über das Stratum Corneum erfolgen (Abbildung 3.1b). Die Haut wurde 12 Stunden lang neben destilliertem Wasser und einer 20%igen Kochsalzlösung auch einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre ausgesetzt. Zusätzlich wurden Untersuchungen mit Hautstanzen gemacht, die für ebenfalls 12 Stunden vollständig mit Vaseline versiegelt wurden sowie direkt nach Entnahme aus der Transportdose cryofixiert wurden.
- Schließlich wurden ein zeitabhängiges **Glycerin-experiment** durchgeführt, bei dem Glycerin* für 2 beziehungsweise 6 Stunden appliziert wurde. Verwendet wurde Gesichtshaut einer 60jährigen Spenderin, bei der ebenfalls ein Stoffaustausch präparativ ausschließlich über das Stratum Corneum ermöglicht wurde (Abbildung 3.1b).

Bei der Anlieferung in der luftdichten Transportdose war die Haut einer Wasserdampf-atmosphäre ausgesetzt und daher stets hydratisiert; der ursprüngliche ambiente Zustand war praktisch nicht wiederherzustellen. Als Referenz im Haupt- und Kontroll-experiment wurde daher eine gesättigte Wasserdampf-atmosphäre gewählt, indem die Haut 100 % Luftfeuchtigkeit ausgesetzt wurde. Bei den Versuchen mit den Salzlösungen konnte man die Hydratation der Haut bei Anlieferung gegenüber dem extern applizierten Wasserangebot vernachlässigen. Bei einer kompletten Versiegelung der Oberfläche mit Vaseline im Kontroll-experiment schließlich wurde von der Dermis-Seite aus Zellkulturmedium angeboten, sodaß sich auch hier nach 12 Stunden ein Gleichgewichtszustand eingestellt haben sollte, der weitaus mehr von der Osmolarität der beteiligten Biostrukturen abhängt als von einer eventuellen Wasseraufnahme bei der Anlieferung der Haut. Der genaue geometrische

* 1,2,3-Propantriol

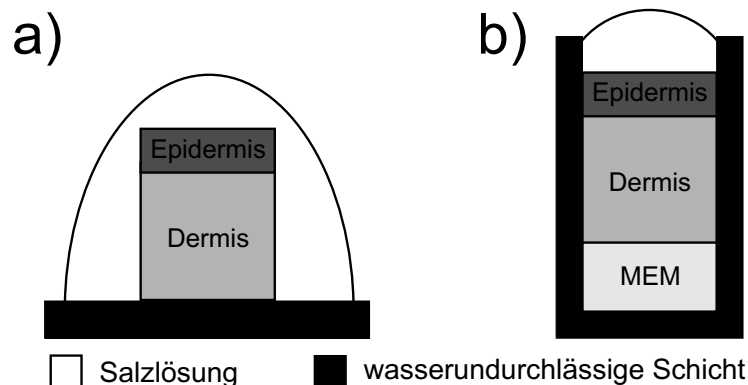


Abbildung 3.1: Aufbau für die Quellversuche: a) in diesem Aufbau ist ein Einfluß von Wasser senkrecht und parallel zur Epidermis möglich. b) durch wasserundurchlässige Schichten (Vaseline oder ein einfacher Plastikschauch) ist nur Wasserinflux durch die Epidermis möglich. Das Zellkulturmedium (MEM) ernährt gleichzeitig kontinuierlich die Haut.

Aufbau der Quellversuche wurde unterschiedlich für Hauptexperiment einerseits sowie Kontrolleexperiment und Glycerinexperiment andererseits gewählt, um so die unterschiedlichen Penetrationswege in die Haut zu studieren.

Bei Behandlung von humaner Haut mit verschiedenen konzentrierten Salzlösungen hat sich gezeigt, daß sie dadurch mechanisch sehr instabil wird und bereits kleine Kräfte ausreichen, um einen Großteil des Stratum Corneums zu entfernen: So wurden in ersten Versuchen zunächst große Hautflächen definiert hydratisiert und danach die 3 mm-Hautstanzen entnommen. Die damit verbundenen Kräfte reichten aus, um reproduzierbar das Stratum Corneums bis auf die untersten 6 Schichten zu entfernen. Auch wurden Versuche gemacht, die Haut *in vivo* durch Auflage eines mit destilliertem Wasser durchtränkten Stoffpolsters zu hydratisieren. Bereits nach 2 Stunden begannen sich aber bei normalen Bewegungen die Corneozyten so massiv abzulösen, daß dieser Versuch abgebrochen werden mußte. Um einerseits die Haut definiert befeuchten zu können und andererseits das gesamte Stratum Corneum zu erhalten, wurden daher zuerst die Hautstanzen entnommen und diese dann den Salzlösungen ausgesetzt. Beim Gefrieren wurde jede unnötige mechanische Belastung vermieden. Nach ihrer 12 stündigen Quellung bei 5 °C wurden die Stanzen unverändert eingefroren. Um zusätzliche Kräfte zu vermeiden, wurden eventuell noch auf der Oberfläche befindliche Flüssigkeiten nur teilweise bzw. von außen applizierte wasserundurchlässige Schichten (vergleiche Abbildung 3.1) überhaupt nicht entfernt sondern mitgefroren. Sie konnten problemlos im Ultramikrotom mitgeschnitten, in der Gefrierätzanlage bedampft und dann auch im Mikroskop untersucht werden (vergleiche Abbildung 4.15 auf Seite 79).

3.1.3 Morphologieuntersuchungen an hochdruckgefrorenen Proben

Um die Feinstruktur der Dermis, Epidermis und insbesondere des Stratum Corneums im nativen Zustand zu untersuchen, wurde Haut auch ohne externe Hydratation hochdruckgefroren, um damit den besten Strukturertalt zu gewährleisten. Die so erhaltenen Proben wurden dann wie folgt weiterpräpariert und -mikroskopiert:

- Schnitt der hochdruckgefrorenen Proben im Ultramikrotom, Bedampfung mittels Pseudo-Replika-Technik und Mikroskopie im Rasterelektronenmikroskop im kalten Zustand. (Hierfür wurden ausschließlich *in vivo*-Proben verwendet, die innerhalb von 3 Minuten nach Entnahme gefroren wurden.) Um sie überhaupt handhaben zu können, wurde eine spezielle Spannzange verwendet (vergleiche Abbildung 3.2), in der die Probe die gesamte Präparation verblieb.
- **Gefriersubstitution** der Proben, Einbettung in Kunststoff und nachfolgend Anfertigung von Dünnschnitten im Ultramikrotom bei Raumtemperatur und Mikroskopie im Transmissionselektronenmikroskop.



Abbildung 3.2: Größenvergleich der Hautproben. Links: schwarzes Papierstück (*) in der Größe einer hochdruckgefrorenen Hautstanze samt der verwendeten Spannzange für Schnitt und Transport. Rechts: 3 mm-Hautstanze in der Größe der plungegefrorenen Proben. In der Mitte ein Euro-Cent als Größenvergleich.

3.2 Cryo-Präparation und Mikroskopie

Wie bereits am Anfang dieses Kapitels beschrieben, muß für eine zuverlässige statistische Analyse des Hydratationsverhaltens darauf geachtet werden, daß eben dieses nicht durch die Probenpräparation ungewollt verfälscht wird. Diese Gefahr besteht beim Gefrieren (im Gegensatz zur chemischen Fixation) nicht; allerdings darf dann das in der Probe arretierte Wasser weder entfernt noch substituiert werden. Dies macht eine spezielle Präparation

notwendig, bei der insbesondere die Probe stets gefroren bleibt – vorzugsweise bei Temperaturen unter $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, um auch eine Rekristallisation zu vermeiden. Abbildung 3.3 gibt dazu einen Überblick und die folgenden Abschnitte vertiefen die einzelnen Schritte.

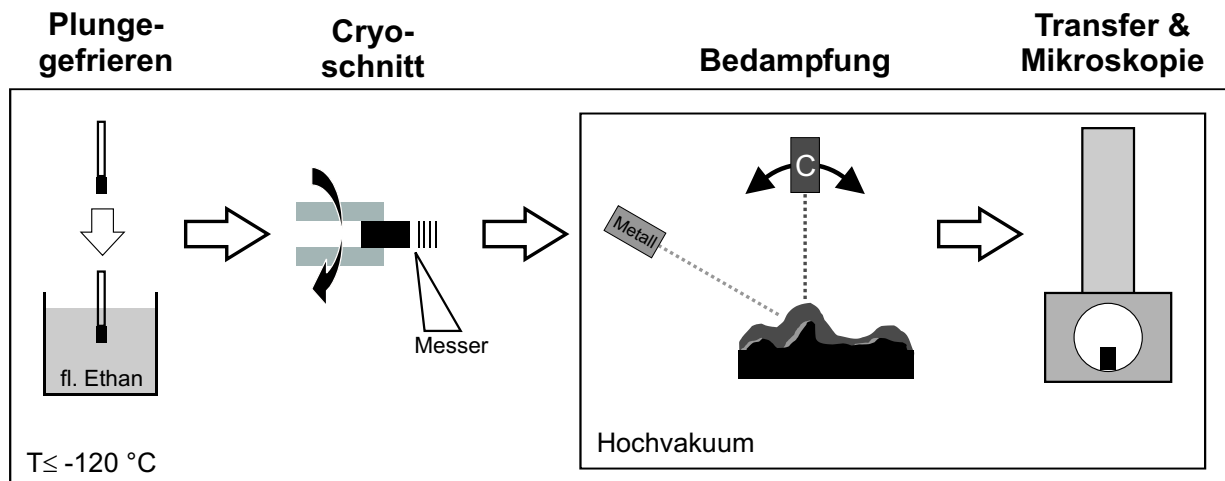


Abbildung 3.3: Übersicht über die Cryopräparation: Alle Schritte müssen bei Temperaturen unter $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgeführt werden, um eine Rekristallisation des Wassers der Probe zu vermeiden. Die Bedampfung mit Kohlenstoff (C) und einem Schwermetall sowie die Mikroskopie muß zusätzlich unter Hochvakuum stattfinden.

3.2.1 Cryoschnitte an Hautproben

Prinzipiell können von gefrorenen Proben Dünnschnitte angefertigt und dann im Transmissionselektronenmikroskop mikroskopiert werden. Da diese allerdings sehr sensitiv bezüglich Bestrahlung mit Elektronen sind, muß die Strahlexposition und Dauer folglich so gering wie möglich gehalten werden. Für die Fragestellungen dieser Dissertation waren diese Rahmenbedingungen nicht zu erfüllen, sodaß von allen gefrorenen Hautstanzen im Cryo-Ultramikrotom ausschließlich Querschnitte angefertigt wurden (vergleiche Abbildung 3.4 auf der folgenden Seite), die wesentlich stabiler sind.

Zunächst wurde circa 1 mm mittels grober 800 nm Schnitte abgetragen. Daran schloß sich der Feinschnitt durch 50 nm Schnitte an, bis in der Summe weitere 40 μm abgetragen wurden. Die Schnittgeschwindigkeit war jeweils unverändert 1 mm/s . Messer und Probe wurden auf konstant $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt.

Zum Einsatz kamen dabei bis zu zwei Diamantmesser: Der grobe Vorschnitt wurde stets mit einem Trimmdiamanten bewerkstelligt, denn er besitzt eine breite Klinge und ist mechanisch sehr stabil. Der Feinschnitt allerdings erfolgte für die hochdruckgefrorenen Proben mit einem speziellen Cryodiamantmesser, mit dem sich qualitativ wesentlich höherwertige

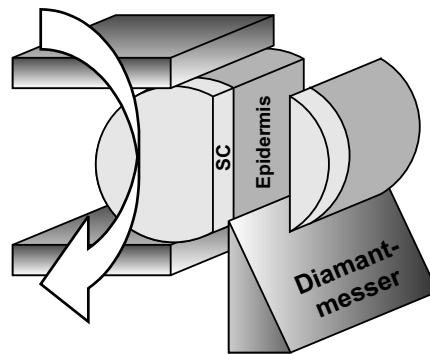


Abbildung 3.4: Cryoschnitte an Hautproben. SC=Stratum Corneum (Elemente der Zeichnung untereinander nicht maßstabsgetreu).

Oberflächen* präparieren ließen, was eine Abbildung der Mikroorganisation innerhalb der Zellen erlaubte. Allerdings war dieses Messer mechanisch sehr viel empfindlicher, sodaß nur noch dünne Schnitte mit begrenzter Geschwindigkeit abgetragen werden konnten. Da beim Plungefreezing die Mikroorganisation innerhalb der Zellen größtenteils durch Segregation verändert oder zerstört war, wurde hingegen der Feinschnitt bei den plungegefrorenen Proben ebenfalls mittels des Trimmdiamanten mit den eben genannten Schneideparametern angefertigt. Für die Ausmessung der Dicken im Stratum Corneum und eine Beurteilung der Gesamtmorphologie war die Schnittqualität mehr als ausreichend.

3.2.2 Transfer und Gefrierätzung

Nach dem Schnitt wird die Probe in flüssigem Stickstoff gelagert und transportiert, um sie einerseits ausreichend zu kühlen und sie andererseits vor Kontakt mit Luftfeuchtigkeit zu schützen. Die folgenden Präparationsschritte müssen unter Hochvakuum stattfinden. Bei dem notwendigen Transfer aus dem flüssigen Stickstoff heraus in die Hochvakuumanlage[†] kommt die Probe kurzzeitig in Kontakt mit der normalen Atmosphäre und damit der Luftfeuchtigkeit. Um trotzdem die entstehenden Kontaminationen möglichst gering zu halten, wurde ein spezielles Transfersystem entwickelt. Es stellt sicher, daß die Probe nach Herausnahme aus dem flüssigen Stickstoff nur Kontakt mit einem Strom aus gasförmigem trockenem Stickstoff hat. Kann eine Kontamination mit Wasser auch nicht vermieden werden[‡], so ist sie doch stark vermindert. Die verwendete Hochvakuumanlage ist mit zwei Elektronenstrahlverdampfern sowie einem Heiz-Kühltisch ausgestattet, der die Probe auf jede beliebige Temperatur zwischen -160 °C und $+30\text{ °C}$ temperieren kann.

Die hochdruckgefrorenen Proben mit ihrem kleinen Volumen wurden für die hochauflösen-

* beispielsweise zeigten sich praktisch keine Messerscharten oder Kompressionen der Oberfläche.

[†] Typ *BAF060* der Firma Bal-Tec [66].

[‡] Es finden sich selbst im flüssigen Stickstoff Eiskristalle, die auf der präparierten Probenoberfläche absorbieren und nukleieren können.

de Rasterelektronenmikroskopie nur sehr vorsichtig gefriergeätzt (typischerweise wurde nur circa 10 nm Eis von der Oberfläche entfernt)*, wohingegen die wesentlich größeren plungegefrorenen 3 mm Stanzen zur Vermessung der Zelldicken stärker geätzt wurden, das heißt es wurde viel Wasser aus dem Zytoplasma entfernt, sodaß dieses leicht kollabiert. Die sehr stabile und lipidreiche Cornified Envelope blieb davon jedoch relativ unbeeinflusst und wurde als exponierte Struktur durch den Schattenwurf bei der anschließenden Elektronenstrahlbedampfung (vergleiche folgendes Kapitel) sehr stark im Kontrast hervorgehoben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde typischerweise 15 Minuten bei $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ beziehungsweise 30–40 Minuten bei $-105\text{ }^{\circ}\text{C}$ jeweils bei einem Druck von etwa $8 \cdot 10^{-6}$ Pa geätzt. Zwischendurch kann bei Bedarf die Probe ins Rasterelektronenmikroskop transferiert werden, um den Fortschritt bei der Wasser-Sublimation zu kontrollieren (vergleiche Abbildung 3.5). Zum Einsatz kommt dabei ein Transfersystem [81] der Firma Bal-Tec [66]. Es erlaubt den Transport unter Hochvakuum über begrenzte Strecken. Dabei ist die Probe umgeben von einem Kupferschild, das durch flüssigen Stickstoff gekühlt wird und sie somit als Kältefalle vor (Eis)Kontaminationen schützt. Nach erfolgtem Transfer der Probe in das Elektronenmikroskop oder die Vakuumanlage konnte das Transfersystem wieder vollständig entfernt werden.

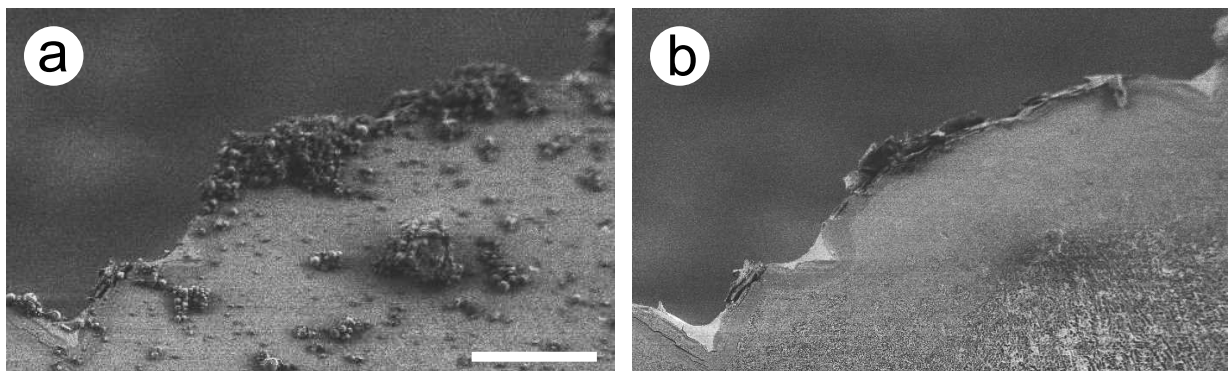


Abbildung 3.5: Gefrierätzung an einem Cryo-Hautschnitt: Direkt nach Transfer in die Hochvakuumanlage hat sich Eis auf der präparierten Oberfläche – insbesondere an den Kanten – niedergeschlagen, sodaß das Stratum Corneum dadurch größtenteils verdeckt wird (a). Durch Temperaturerhöhung im Vakuum (Gefrierätzen) kann diese Eisbelegung kontrolliert entfernt werden (b). Maßbalken: 50 μm .

3.2.3 Bedampfung

Die Bedampfung geschieht nach der Pseudo Replika Technik, indem mittels der Elektronenstrahlverdampfer zunächst 6 nm Schwermetall (Wolfram oder Platin) unter einem Elevationswinkel von 30° auf die zu untersuchende Oberfläche aufgebracht wird. Durch diesen

* denn es wurden 10 nm hohe Strukturdetails auf der Oberfläche sichtbar, die vor dem Ätzen völlig eben war.

sehr flachen Winkel erzeugen schon kleine topographische Erhebungen große Schatten*, das heißt Bereiche, in die kein Schwermetall hingelangt und damit im Elektronenstrahl kaum Signal erzeugen (vergleiche Abbildung 2.18b auf Seite 39). Anschließend wird 40 nm Kohlenstoff verdampft, wobei der Einfallswinkel kontinuierlich zwischen 10° und 90° verändert und die Probe dabei um ihre eigene Achse rotiert wird[†], wodurch ein dicker und nahezu homogener Kohlenstofffilm entsteht.

3.2.4 Mikroskopie im REM

Zur Mikroskopie der Cryoproben wird ein *LEO Gemini 1530* [82] mit einer thermischen Feldemissionsquelle genutzt. Es ist zusätzlich mit einem Heizkühltisch ausgestattet, um eine optimale Probentemperatur auch während der Abbildung sicherzustellen. Die Metallbedampfung zusammen mit der Detektion der rückgestreuten Elektronen durch einen konzentrischen YAG-Ringdetektor[‡] erlaubt eine hochauflösende Darstellung der Oberfläche der gefrorenen Proben [83]. Die Primärelektronen hatten typischerweise eine Energie von 7 keV; der Strahlstrom betrug circa 15 pA.

Abbildungseigenschaften der verschiedenen Detektoren In Abschnitt 2.2.3 ab Seite 17 wurden die drei Elektronendetektoren für die Rasterelektronenmikroskopie zusammen mit ihren spezifischen Eigenschaften diskutiert. Hier soll nun dargelegt werden, warum die Detektion der Rückstreuelektronen bei der gewählten Probenpräparation die beste Abbildungsqualität ermöglicht.

Wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, treten **Sekundärelektronen** überall dort auf, wo bewegte Elektronen mit Materie wechselwirken; sie entstehen somit in Biomaterial der Probe selbst, in der aufgedampften Metallschicht und in der darauf folgenden Kohlenstoffschicht. Während Sekundärelektronen aufgrund ihrer geringen kinetischen Energie in tieferen Bereichen nahezu vollständig absorbiert werden, können solche aus dem äußersten Bereich der Kohlenstoffschicht die Oberfläche verlassen. Ihre Detektion liefert daher ein Bild eben dieser Oberflächenschicht, die jedoch sehr dick (bis 40 nm) und homogen aufgedampft wurde. Details der eigentlichen Probenoberfläche wirken daher grundsätzlich verschwommen (vergleiche Abbildung 3.6b&c auf der nächsten Seite). Im Bild des Everhart-Thornley-Detektors mit positivem Kollektorpotential Φ (3.6c) sieht man zudem deutlich den Einfluß des Kantenkontrastes: An den Zellgrenzen, die nahezu senkrecht abfallen, werden durch den Primärelektronenstrahl viele Sekundärelektronen erzeugt, die die Oberfläche verlassen können. Sie werden zum Everhart-Thornley-Detektor beschleunigt und detektiert, wodurch eine auffällige Signalüberhöhung an Kanten (sichtbar als strahlend helle Bereiche in den Bildern) zustande kommt. Beim InLens-Detektor fehlt hingegen das attraktive elektrische Potential des Everhart-Thornley-Detektors, sodaß an Kanten weniger Sekundärelektronen detektiert werden, obwohl sie weiterhin in gleicher Anzahl die

* vergleichbar dem langen Schatten, den eine tiefstehende Sonne bewirkt.

[†] dies wird Kipprotationsbedampfung genannt. Im Englischen: DARS=Double Axis Rotary Shadowing.

[‡] Bestehend aus einem Yttrium Aluminium Granat Kristall, mit Cer dotiert. Hersteller: AutraDet, Mecirova 17, 61200 Brno, Tschechische Republik

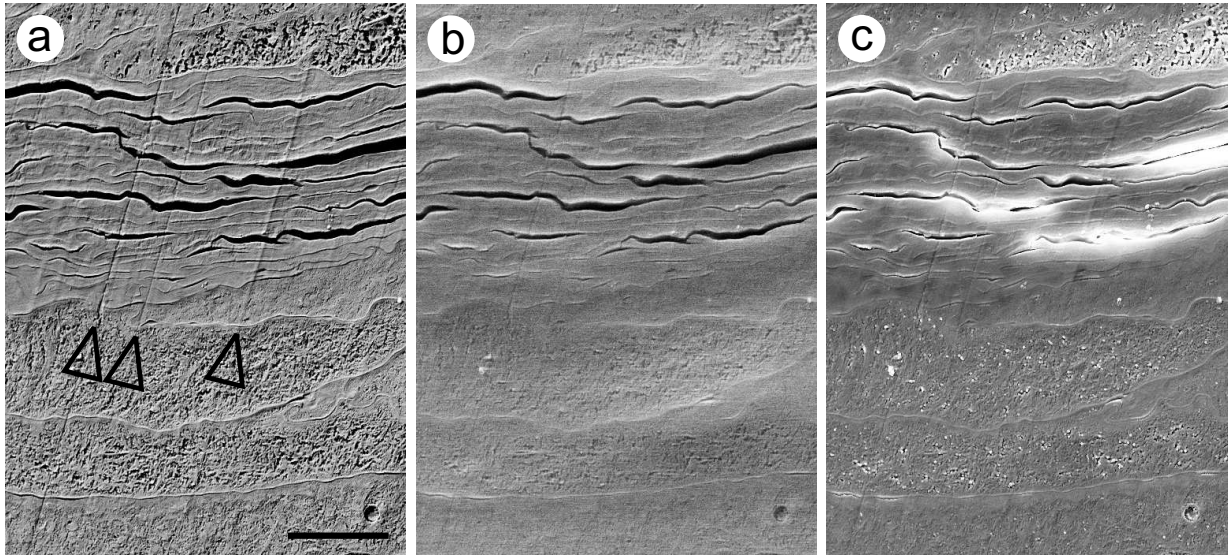


Abbildung 3.6: Vergleich verschiedener Rasterelektronenmikroskop-Detektoren bei der Abbildung des Stratum Corneum: (a) Rückstreudetektor; (b): InLens-Detektor; (c): Everhart-Thornley-Detektor mit positivem Kollektorpotential Φ . Der Kantenkontrast bei Sekundärelektronen bewirkt lokal eine starke Signalüberhöhung, die sich als weiße Bereiche in Bild (c) zeigt. Messerscharten als Strukturdetail der Oberfläche sind in (a) mit Pfeilen gekennzeichnet. Maßbalken: 3 μm

Oberfläche verlassen. Die Signalüberhöhung durch den Kantenkontrast ist folglich weniger stark ausgeprägt (3.6b).

Die **Rückstreuelektronen** entstehen hauptsächlich durch Wechselwirkung mit schweren Kernen, das heißt bei der gewählten Bedampfung mit der Schwermetallschicht. Aufgrund der relativ leichten Kohlenstoffkerne durchlaufen die Rückstreuelektronen wegen ihrer hohen kinetischen Energie die darüberliegende Kohlenstoffschicht praktisch ohne weitere Wechselwirkungen und können so die Oberfläche verlassen und detektiert werden. Das Signal wird daher nur durch die Schwermetallschicht determiniert, die ihrerseits wegen des flachen Elevationswinkels in ihrer Homogenität wesentlich von der Proben topographie bestimmt wird. Sie zeigt sich daher in hoher Auflösung im Bild des konzentrischen Ringdetektors für Rückstreuelektronen (3.6a): So werden feine Strukturdetails wie Messerscharten und Zellgrenzen wesentlich deutlicher abgebildet als bei Detektion der Sekundärelektronen (vergleiche Abbildung 3.6a mit b&c). Zudem wird das Bild aufgrund der hohen Energien der Rückstreuelektronen auch kaum durch eventuelle Aufladungen der Probe verfälscht.

3.2.5 Bildauswahl und -auswertung

Abgrenzung des Stratum Corneums vom Stratum Granulosum Bei der Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder hat sich gezeigt, daß man in der Praxis das Stratum Granulosum meist eindeutig vom Stratum Corneum abgrenzen kann (sie-

he Abbildung 3.7): Das Stratum Granulosum als lebendes Gewebe enthält Zellkerne und verschiedene Organellen, die sich deutlich abzeichnen. Im Stratum Corneum hingegen fehlen Organellen größtenteils und der Zellkern wird abgebaut, ist also höchstens noch als Fragment sichtbar. Zudem differieren bei plungeteefrorenen Proben die Segregationsmuster des Stratum Granulosums deutlich von dem der untersten Corneozyten, das meist sehr viel größer erscheint. Der Grund ist der unterschiedliche Wassergehalt (Stratum Corneum: circa 15 %-40 %, Stratum Granulosum: circa 40 %-70 % [24], [21]) und unterschiedliche Mikroorganisation (insbesondere der Gehalt an Substanzen, die die Unterkühlbarkeit des Zellwassers erhöhen). Zudem besitzen Corneozyten die Cornified Envelope, sodaß sich die Zellgrenzen im Stratum Corneum wesentlich deutlicher abzeichnen als im Stratum Granulosum.

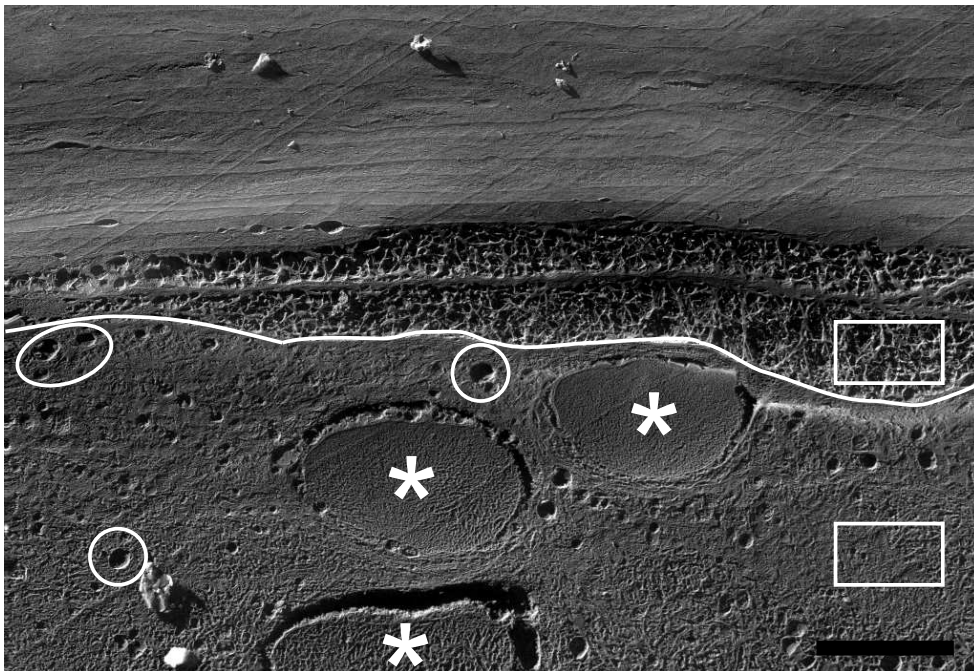


Abbildung 3.7: Der Übergang vom Stratum Granulosum zum Stratum Corneum ist hier markiert mit einer durchgezogenen Linie. Das Stratum Granulosum ist identifizierbar durch die enthaltenen Zellkerne (*), durch Organellen (eingekreist) sowie durch das Segregationsmuster, das viel feiner ist als das der ersten Stratum Corneum-Schichten (Rechtecke). Meßbalken: 5 μm .

Identifikation der Schichten im Stratum Corneum Als Zellverband zeigen benachbarte Corneozyten vielfach einen deutlich ausgeprägten fließenden Übergang und bilden so zusammenhängende Schichten (Abbildung 3.8a auf der nächsten Seite). Allerdings ist eine korrekte Zuordnung eines Corneozyten zu einer Schicht nicht immer eindeutig möglich, wie durch Abbildung 3.8b demonstriert wird: Dort gehört der gleiche Corneozyt zu zwei un-

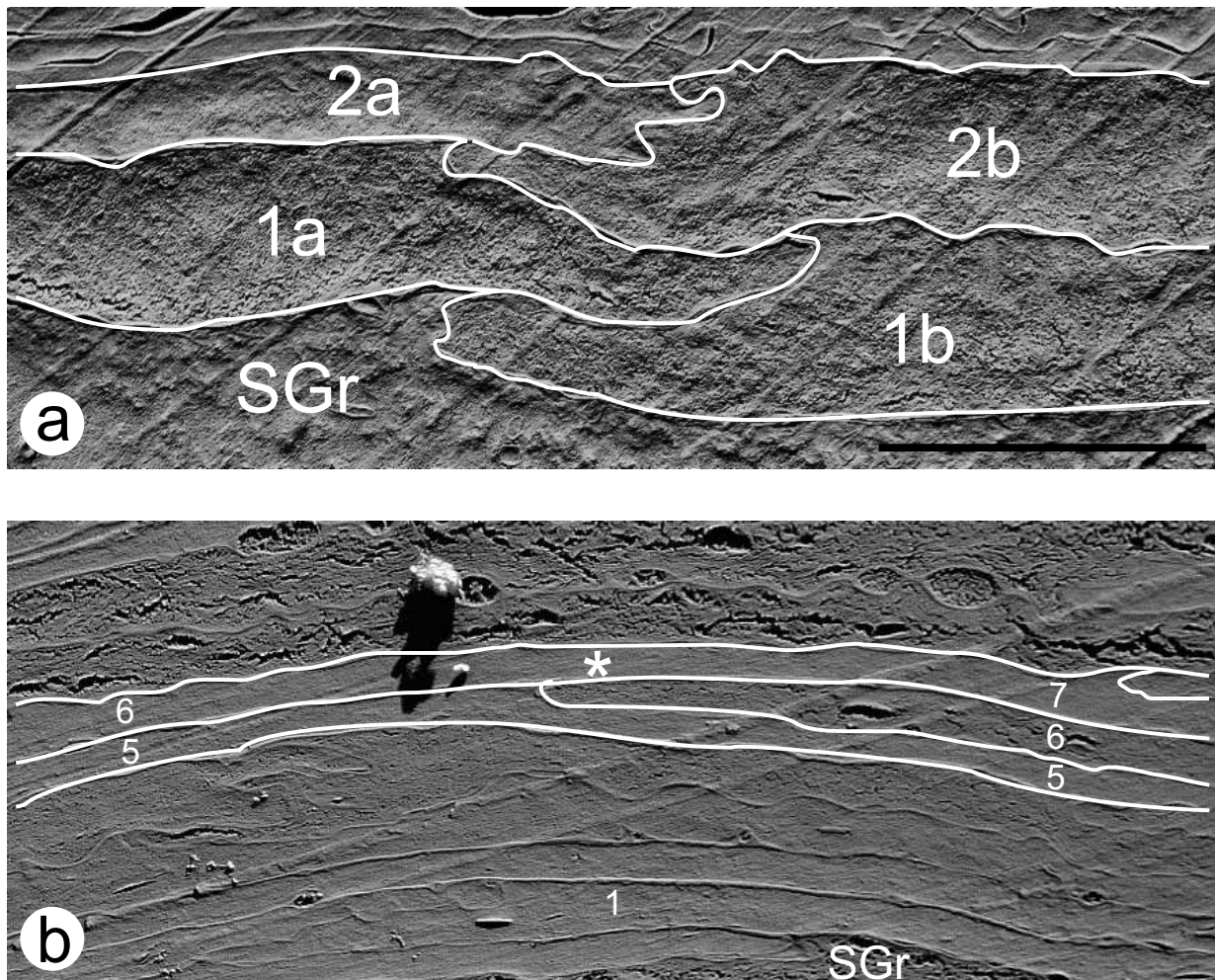


Abbildung 3.8: Zellübergänge im Stratum Corneum: (a) Bei dieser Anordnung bilden die Corneozyten 1a und 1b die erste sowie 2a und 2b die zweite Schicht des Stratum Corneums über dem Stratum Granulosum (SGr). (b) bei Auszählung auf der linken Seite des Bildes würde man den markierten Corneozyt (*) zur Schicht 6 zählen; auf der rechten Seite hingegen zu Schicht 7. Meßbalken: 5 μm .

terschiedlichen Schichten. Solche Bilder würden zweideutige Ergebnisse liefern und wurden daher nicht ausgewertet.

Dickenmessungen Von den plungegefrorenen Proben wurden für die Vermessung der Zellgeometrie nur solche Stellen im Stratum Corneum ausgewählt, in denen die einzelnen Schichten homogen übereinander liegen. Diese regelmäßige Anordnung war insbesondere in Hautfalten und in der Nähe von Haaren nicht gegeben, sodaß diese Bereiche für die Auswertung nicht herangezogen wurden. Die Zelldicken wurden an den digitalen Bildern

mittels des Softwarepakets *KS400* der Firma Zeiss* semiautomatisch vermessen. Für jede Behandlung wurde von jeder Schicht 20-70 unabhängige Dickenmessungen durchgeführt; insgesamt wurden dafür 22 Biopsien präpariert und vermessen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Dicken der einzelnen Corneozyten an repräsentativen Stellen gemessen wurden (vergleiche Abbildung 3.9 auf der nächsten Seite). Mit Schicht 1 wurde stets die erste Schicht des Stratum Corneum direkt über dem Stratum Granulosum bezeichnet.

3.3 Präparation und Mikroskopie gefriersubstituierter Proben

3.3.1 Gefriersubstitution

Der genaue Ablauf der Gefriersubstitution wurde für diese Dissertation den praktischen Erfordernissen angepasst (vergleiche Tabelle 3.2 auf Seite 57). Wie allgemein üblich mußten alle benutzten Medien vor dem Einsatz vorgekühlt sein, damit die Probe nicht ungewollt erwärmt wird und das darin noch enthaltene Wasser dabei umkristallisiert. Auch mußte sichergestellt sein, daß sich nicht unkontrolliert Luftfeuchtigkeit auf der kalten Probe niederschlägt, denn dies könnte die Polymerisation erschweren. Alle diese Anforderungen erfüllt die automatische Gefrier-Substitutions-Anlage *Leica EMASF* der Firma Leica [84]. Sie ermöglicht eine genaue Ablaufsteuerung der Temperatur im Präparationsraum, der normalerweise durch einen Glasschieber zur Raumatmosphäre hin verschlossen ist. Wird er (beispielsweise zum Wechsel der Substitutionsmedien) geöffnet, verdampft automatisch flüssiger Stickstoff, sodaß im Präparationsraum eine kalte Stickstoffatmosphäre gegen Kontaminationen mit Luftfeuchtigkeit entsteht. Die Medien selbst werden mit wasserfreiem Aceton bzw. Ethanol angesetzt und sofort verschlossen, um Kontaminationen zu vermeiden.

Zeitlicher Ablauf der Gefriersubstitution

Fixierung Der Aluminium-Probenbehälter aus dem Hochdruckgefrierer wird geöffnet und die darin enthaltene gefrorene Hautprobe in ihrem Inneren in ein 1,5 ml Eppendorf Probenröhrchen mit wasserfreiem Aceton eingebracht, in dem Uranylacetat im Überschuß gelöst ist. Für 40 Stunden wird die Temperatur bei -90°C konstant gehalten. In dieser Zeit wird die gesättigte Uranylacetat-Lösung zweimal erneuert, um durch das darin enthaltene Aceton das der Probe anhaftende Hexadeken zu entfernen, weil es sonst jegliche Penetration in das Probenmaterial behindern würde. Gleichzeitig wird in der Probe enthaltenes Wasser durch Aceton ausgetauscht.

Dann erfolgt eine Temperaturerhöhung auf -70°C und nach 12 Stunden eine weitere auf -50°C . Durch die entsprechend erhöhte Molekularbewegung soll das Uranylacetat schneller und vollständig durch das gesamte Gewebe diffundieren und gleichzeitig das Wasser schneller gegen Aceton ausgetauscht werden. Das Wasser der Probe ist zu diesem Zeitpunkt

* Carl Zeiss, Carl Zeiss Straße 22, D-73447 Oberkochen, Deutschland. <http://www.zeiss.de> ; info@zeiss.de

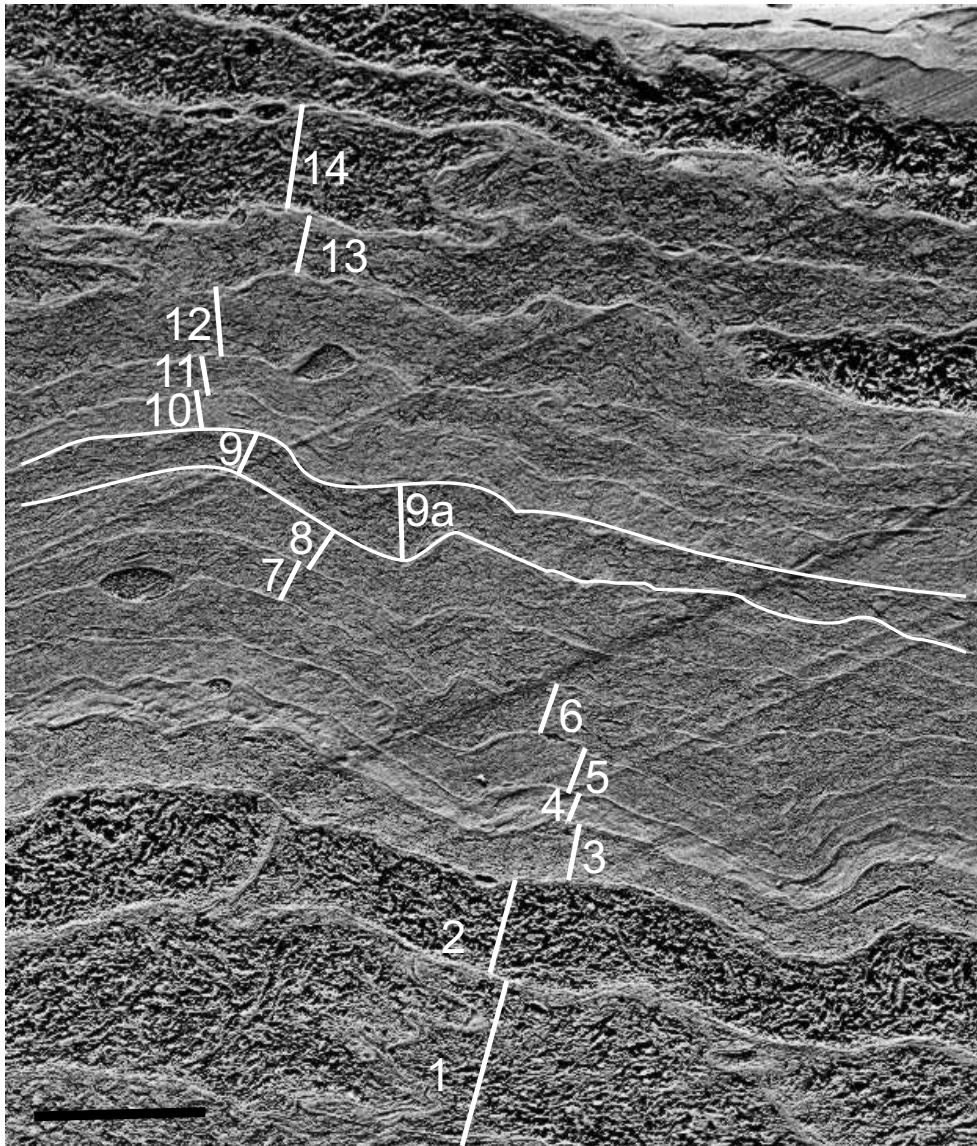


Abbildung 3.9: Repräsentative Dickenmessung im Stratum Corneum: Die Schichten des Stratum Corneum werden mit 1 beginnend durchnummeriert. Die Messung der Dicken erfolgt an repräsentativen Stellen: So ist in Schicht 9 die Position 9a nicht geeignet, da hier offenbar eine lokale Verdickung vorliegt. Meßbalken: 3 μm .

größtenteils durch Aceton ersetzt. Da das Uranylacetat allerdings die späteren Schritte der Gefriersubstitution stören würde (insbesondere die Polymerisation des HM20), folgen nach 12 Stunden im Abstand von je einer Stunde Spülschritte mit reinem Aceton und viermal reinem Ethanol. Dadurch wird auch das restliche Wasser der Probe gegen Ethanol ausgetauscht (Entwässerung).

Medium	Dauer [h]	Temperatur [°C]
UAc in Aceton	40	−90
UAc in Aceton	12	−70
UAc in Aceton	12	−50
Aceton	1	−50
Ethanol	1	−50
Ethanol	1	−50
Ethanol	1	−50
Ethanol	1	−50
50 % Monomer	2	−35
66 % Monomer	2	−35
100 % Monomer	2	−35
100 % Monomer	2	−35
100 % Monomer	2	−35
100 % Monomer	14	−35
UV-Licht	48	−35
UV-Licht	24	RT

Tabelle 3.2: Zeitlicher Ablauf der Gefriersubstitution

Einbettung Nach einer Temperaturerhöhung auf -35°C werden die Hautproben für 2 Stunden in eine 50%ige und danach für 2 Stunden in eine 66%ige Lösung des Monomers in Ethanol transferiert. Anschließend kommen sie für insgesamt 20 Stunden in reines Polymer, welches in dieser Zeit dreimal erneuert wird. Abschließend wird zwei Tage lang polymerisiert. Da dies bei UV-Licht geschieht, muß aufgrund der Geometrie der Gefrier-Substitutions-Anlage zusätzlich noch eine Nachpolymerisierung außerhalb der Anlage stattfinden. Erst dann stellt sich eine charakteristische gelbe Färbung des Polymers ein, die eine vollständige Polymerisation signalisiert.

Praktische Realisierung

Bedeutung der Entwässerung Nach der Fixation des Gewebes durch UAc und dem anschließenden Aceton-Spülschritt folgen mehrere Ethanol-Spülschritte, um das verbleibende Wasser in der Probe durch Ethanol auszutauschen. Es hat sich gezeigt, daß hierfür Ethanol wesentlich besser geeignet ist als Aceton, da ersteres bei der Substitutionstemperatur von -50°C sehr viel mehr Wasser aufnehmen kann. Wasserreiche Probenbereiche, wie beispielsweise das Kollagen, werden mit Aceton nur unzureichend entwässert, sodaß sie von dem hydrophoben HM20 schlecht infiltriert werden können und nach Polymerisation und anschließendem Dünnschnitt an diesen Stellen Löcher entstehen (Abbildung 3.10a auf der nächsten Seite).

Das entwässerte Gewebe wird zunächst mit 50%igem, dann mit 66%igem und erst danach

mit reinem Monomer in Kontakt gebracht. Auch hier hat sich gezeigt, daß dies präparationstechnisch notwendig ist. Bei instantanem Einsatz von reinem Monomer käme es zu einem maximalen Gradient zwischen dem Inneren der Probe und dem Medium.* Praktisch äußert sich das durch eine ausgeprägte Extraktion von Zellbestandteilen, sodaß diese im Inneren – bis auf die Überreste der kollabierten Intermediärfilamente – wie leer wirken (Abbildung 3.10b). Es hat sich daher bewährt, zunächst nur eine 50 %ige Monomerlösung einzusetzen, weil dann der Gradient nur halb so groß ist.†

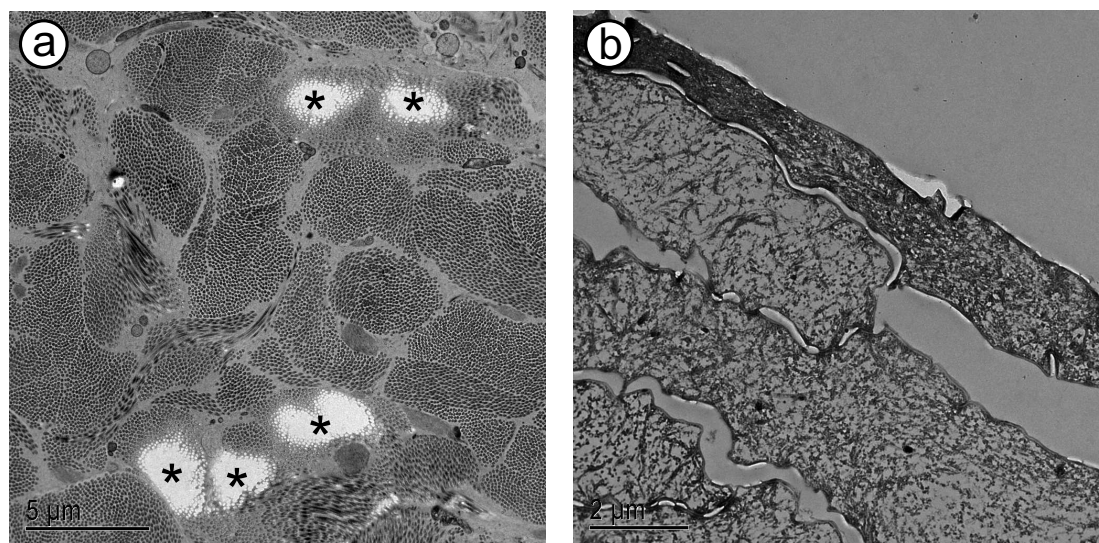


Abbildung 3.10: Artefakte bei der Gefriersubstitution: a) Löcher in Kollagenbündeln (markiert durch *) durch unvollständige Wasserextraktion b) Extraktion von Zellbestandteilen durch zu hohen Monomergradient hinterläßt "leere" Zellen

Transportkörbchen Um die Hautproben während der Gefriersubstitution besser handhaben zu können, wurden sie zunächst aus dem Probensandwich des Hochdruckgefrierers entnommen und in spezielle Transportkörbchen deponiert (vergleiche Abbildung 3.11 auf der folgenden Seite). Ein Kontakt mit dem Medium ist durch eingearbeitete Netze möglich, die dabei engmaschig genug sind, um die Probe zurückzuhalten. Sie sind aus Kunststoff gearbeitet, weil sich im Praxiseinsatz gezeigt hat, daß daran weniger häufig Luftblasen hängenbleiben als an Metallnetzen. Luftblasen würden aber die freie Stoffdiffusion zwischen Probe und Medium vermindern.

Finale Monomerlösungen HM20 wird aus mehreren Komponenten in einem definierten Verhältnis zusammengemischt. Diese Monomerlösungen können Luftfeuchtigkeit auf-

* $100\% \text{ Monomer}_{\text{außen}} - 0\% \text{ Monomer}_{\text{innen}} = 100\% \text{ Monomer}_{\text{Gradient}}$

† $50\% \text{ Monomer}_{\text{außen}} - 0\% \text{ Monomer}_{\text{innen}} = 50\% \text{ Monomer}_{\text{Gradient}}$

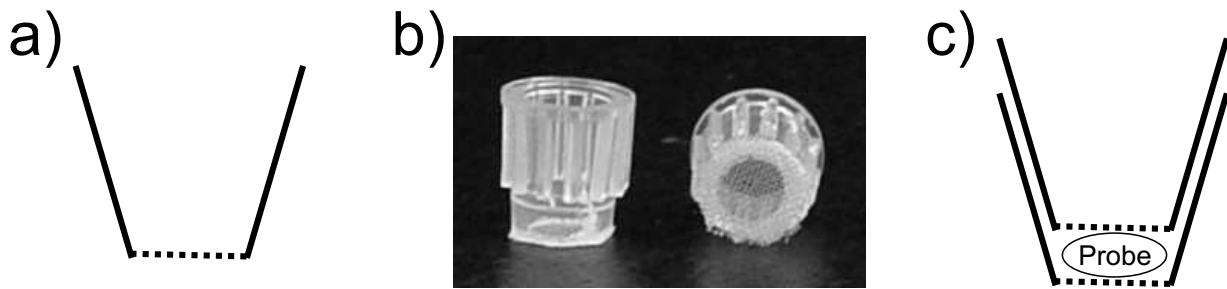


Abbildung 3.11: Transportkörbchen für die Gefriersubstitution: a) Schemazeichnung einer Hälfte (das Netz ist gestrichelt) b) Photographie c) zusammengesteckt hält das Körbchen die Probe fest, ermöglicht aber nach oben und unten einen Stoffaustausch

nehmen, die eventuell bei der späteren Polymerisation Probleme bereitet. Daher wurden für die letzten Substitutionsschritte nur frisch angemischtes Monomer verwendet und jeglicher unnötiger Luftkontakt vermieden. Beim Einsatz in der Gefrier-Substitutions-Anlage verhindert die Stickstoffatmosphäre wie auch die geschlossenen Gefäße eine Kontamination mit Wasser.

3.3.2 Polymer-Dünnschnitte

Für die Anfertigung der Dünnschnitte wurde ein Ultramikrotom der Marke *Ultracut UCT* der Firma Leica [84] genutzt. Der verwendete Diamant hatte einen Messerwinkel von 45° und wurde mit einem Freiwinkel von 6° benutzt. Die Schnittgeschwindigkeit für die 70 nm dicken Schnitte betrug 1 mm/s . Dünnere Schnitte zerfielen meist am Stratum Corneum; außerdem sind dickere Schnitte besser geeignet für die Darstellung bei unterschiedlichen euzentrischen Winkeln.

Es wurden Kupfergrids verwendet, auf die ein Kunststoff (Formvar*) aufgebracht war. Da dieser hydrophob ist und dies Probleme bei der Aufnahme der Schnitte aus dem Wassertrog bereitete, wurden die Grids circa 25 Sekunden bei einem Druck von 10 Pa und einer Temperatur von 20°C einem Gasplasma ausgesetzt. Auf dem Formvar wurden so unabhäufige Ladungen erzeugt, die es hydrophil machten. Die Aufnahme der Schnitte wurde so wesentlich vereinfacht.

3.3.3 Nachkontrastierung

Um im Transmissionselektronenmikroskop die Abbildungsqualität und den Kontrast der Bilder zu verbessern, werden die Grids mit den anhaftenden Schnitten nach unten für 20 Minuten auf einen Tropfen einer 1%igen alkoholischen UAc Lösung[†] gelegt. Die Lösung

* auch bekannt als *Polyvinyl Formal*. Bezugsquelle: <https://secure.2spi.com/>, Distributor für Deutschland: Adi Hassel, Connollystraße 29, 80809 München, Telefon: 089/351-5128, Fax: 089/351-4818.

† 1% UAc in einer 1+1 Mischung aus destilliertem Wasser und reinem Alkohol.

ist lichtempfindlich und sollte daher bei Verwendung und Lagerung möglichst vor Licht geschützt werden. Danach werden die Grids gründlich in destilliertem Wasser gewaschen und 30 Sekunden auf Tropfen einer 0,4%igen Bleicitratlösung gelegt, die mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von circa 12 gebracht wurde. Abschließend wird erneut gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen.

3.3.4 Mikroskopie im TEM

Die kontrastierten Schnitte auf den Grids werden in ein *Tecnai G²12 BioTwin* der Firma FEI [85] mit LaB₆-Kathode im Hellfeldbetrieb bei Raumtemperatur mikroskopiert. Die Elektronen werden mit 100 kV beschleunigt und erzeugen einen Strahlstrom von typischerweise 2 μA -3 μA .

Kapitel 4

Resultate

Im Rahmen dieser Dissertation sind sowohl unterschiedlich präparierte Proben (hochdruck- und plungegefroren, cryopräpariert und gefriersubstituiert) sowie unterschiedliche Abbildungstechniken zum Einsatz gekommen (Rasterelektronenmikroskopie sowie Transmissionsmikroskopie). Auf die unterschiedlichen Präparationen mit ihren Eigenschaften wurde bereits in den vorigen Kapiteln eingegangen. In diesem sollen nun die Ergebnisse vorgestellt werden. Im ersten Abschnitt (4.1) werden zunächst allgemeine morphologische Merkmale der untersuchten Haut beschrieben. Zudem werden die beobachteten Artefakte diskutiert, die durch Präparation und/oder Abbildungsverfahren aufgetreten waren. Die Kenntnis um ihr typisches Erscheinungsbild und ihrer Entstehung hilft, Fehler in der Interpretation der Bilder zu vermeiden. Es schließt sich die Beschreibung weiterer Strukturen der Haut und der Hautanhangsgebilde an (Abschnitt 4.2). Den Abschluß bildet der inhaltliche Hauptteil dieser Arbeit mit den Hydratationsversuchen am menschlichen Stratum Corneum (Abschnitt 4.3). Aufgrund der unterschiedlichen Präparationen und der unterschiedlichen applizierten Medien werden die Ergebnisse des Haupt-, Kontroll- und Glycerinexperiments getrennt voneinander vorgestellt.

4.1 Morphologie der Hautproben

In diesem Kapitel sollen neben der allgemeinen Morphologie der Haut und des Stratum Corneums auch die unterschiedlichen Präparationen und Mikroskopieverfahren vorgestellt werden. Um außerdem Größe und Häufigkeit der Artefakte durch das Plungegefrieren insbesondere im Stratum Corneum besser einschätzen zu können, wurden einige Proben auch hochdruckgefroren, aber ansonsten gleich präpariert. Auch konnte daran der Erhalt der Ultrastruktur insbesondere durch die Ultramikrotomie dokumentiert werden. Die gefriersubstituierten Proben eignen sich nicht für eine Beurteilung des Hydratationszustandes; die Ultrastruktur – wie beispielsweise Lipide, Intermediärfilamente oder die Unterstruktur des Kollagens – kann aber gut aufgelöst werden. Insbesondere kann sie als Vergleich zu den rasterelektronenmikroskopischen Ergebnissen der cryopräparierten Proben dienen.

4.1.1 Artefakte

Es sollen hier die Artefakte gleich zu Beginn vorgestellt werden, da ihre Kenntnis wichtig ist für die Interpretation der Bilder und der Ergebnisse. Zudem lassen sich aus ihnen auch Probeneigenschaften ablesen.

Gefrierartefakte Beim Plungegefrieren hatte das Stratum Corneum zum flüssigen Ethan den unmittelbarsten Kontakt. In Verbindung mit dem geringen Wassergehalt waren hier die Segregationsmuster – mit Ausnahme der beiden untersten Corneozyten-Schichten – meist die kleinsten, die überhaupt in der Probe zu finden waren (im Bereich einiger nm). In der sehr wasserhaltigen Dermis fanden sich bei allen plungegefrorenen Proben stets ausgedehnte Segregationsmuster. Verstärkend kam beim Einfrieren das relativ große Probenvolumen der 3 mm-Stanzen sowie der Abstand der Dermis zur Kontaktfläche mit dem flüssigen Ethan hinzu. Der Strukturerthalt der hochdruckgefrorenen Hautproben insgesamt war wesentlich besser als beim Plungegefrieren, sodaß große Segregationsmuster durch Eisschäden nur selten sichtbar waren.

Schnittartefakte Durch die Verwendung des Trimmessers für sämtliche plungegefrorenen Proben ergeben sich zusammengefaßt folgende Artefakte (vergleiche Abbildung 4.1 auf der folgenden Seite):

- Messerscharten hinterlassen Spuren auf der Oberfläche.
- Probenmaterial kann durch die Relativbewegung zwischen Messer und Probe auf der frisch präparierten Oberfläche komprimiert beziehungsweise verschmiert werden.
- Mechanische Instabilitäten oder Erschütterungen führen zu einem Springen des Messers und zu einem partiellen Herausbrechen von Probenmaterial.

Die beiden ersten Artefakte sind meist lokal begrenzt und/oder durch ihre streng lineare Form von Zellgrenzen eindeutig zu differenzieren und verfälschen die Morphologie – insbesondere die Dickenmessungen – nur unwesentlich. Im letzten beschriebenen Artefakt brechen allerdings die einzelnen Corneozyten in unterschiedlichen Ebenen und mit unterschiedlichen Winkeln zur Oberfläche. Ihre Dicke ist – ebenso wie bei gefriergebrochenen Proben (vergleiche Abbildung 2.16a auf Seite 34) – nicht mehr zuverlässig meßbar. Während die Spuren der Messerscharten nicht zu verhindern waren, konnten die Verschmierungen und das Herausbrechen durch vorsichtige und langsame Schnittführung deutlich vermindert bzw. sogar vollständig vermieden werden. Bei der Cryopräparation der hochdruckgefrorenen Proben wurde hingegen ein Diamantmesser benutzt. Durch die wesentlich höhere Schärfe der Schnittkante gab es praktisch keine Messerscharten oder Verschmierungen auf der Oberfläche. Das letzte vorgestellte Artefakt spielte bei entsprechender Schnittführung keine Rolle.

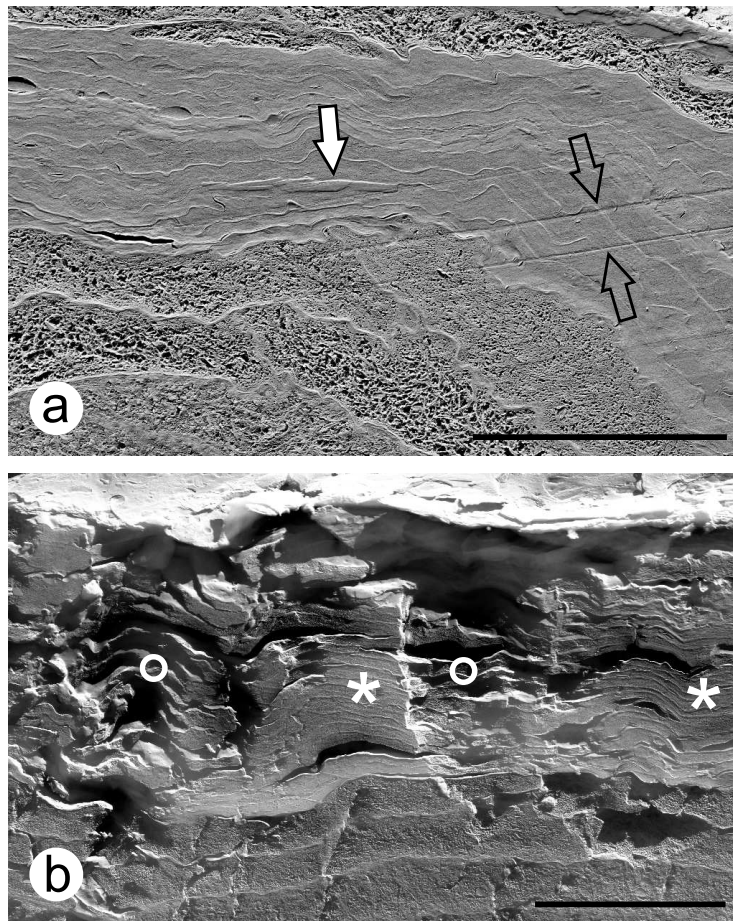


Abbildung 4.1: Artefakte der plungegefrorenen Proben: a) Messerscharten (offene Pfeile) und Verschmierungen (ausgefüllter Pfeil); b) lokales Herausbrechen (o) aus der ansonsten ebenen Oberfläche (*). Meßbalken: 10 µm.

Artefakte der Gefriersubstitution In der Praxis hat sich herausgestellt, daß der Erfolg und die Qualität der Gefriersubstitution erst an ihrem Ende beurteilbar ist. Eine Kontrolle der einzelnen Schritte ist folglich höchstens rückwirkend möglich. In den Ultradünnschnitten war das Stratum Corneum meist abgelöst von der restlichen Epidermis und seine einzelnen Schichten hingen nur noch lose zusammen. Insbesondere die äußersten Lagen lösten sich häufig vollständig von der Hautprobe ab und zeigten sich nach der Präparation im Transmissionselektronenmikroskop sehr elektronendicht. Wurde Osmiumtetroxid während der Substitution eingesetzt, so färbte sich die gesamte Haut tiefschwarz und die UV-Polymerisation wurde praktisch unmöglich gemacht, was in einer unzureichenden Einbettung resultierte. Sind in den Corneozyten trotz des Hochdruckgefrierens Eiskristalle entstanden, so zeigten sich die Intermediärfilamente zerstört (vergleiche beispielsweise Abbildung 4.5a auf Seite 67) oder großflächig kollabiert.

sonstige Artefakte Im Rasterelektronenmikroskop war eine weitere Quelle für Artefakte das Entstehen von Spannungsrissen, beispielsweise durch das Verdampfen von Wasser und/oder Probenmaterial oder durch Temperaturschwankungen. Dies passiert beispielsweise bei einem zu langen Ätzen in der Gefrierätzanlage (vergleiche Abbildung 4.2a), welches genutzt wird, um Eis von der Oberfläche der Probe zu entfernen. Eine konsequente Verminderung aller Wasserkontaminationen während der gesamten Präparation vermindert also auch die entstehenden Artefakte.

Eine weitere Möglichkeit für Verdampfungsartefakte ist die Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe, bei der Energie übertragen wird. Im Rasterelektronenmikroskop entstanden dadurch charakteristische Risse (Abbildung 4.2b). Je höher der Strahlstrom, umso höher die Ionisation in dem Probenmaterial; je höher die Beschleunigungsspannung, umso größer das Volumen, in dem Energie deponiert wird. Der notwendige Strahlstrom ist stark vom benutzten Elektronenmikroskop und der Effizienz der benutzten Detektoren abhängig. In dem benutzten Leo Gemini 1530 war der Strahlstrom 10 pA-15 pA. Die Beschleunigungsspannung des Rasterelektronenmikroskop – und damit die Energie der Primärelektronen – durfte nicht zu niedrig gewählt werden, weil sonst die Rückstreuielektronen eine zu geringe Energie besitzen würden und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des benutzten YAG-Ringdetektors zu schlecht gewesen wäre. 7 kV stellte sich dabei als akzeptabler Kompromiß heraus. An Corneozyten, die direkt an den Spannungsriß angrenzen, ist meist eine deutliche Ausdünnung durch Materialschwund zu erkennen. Sie sind daher in ihrer Dicke später nicht ausgewertet worden. Im Transmissionselektronenmikroskop wurden keine Strahlschäden beobachtet.

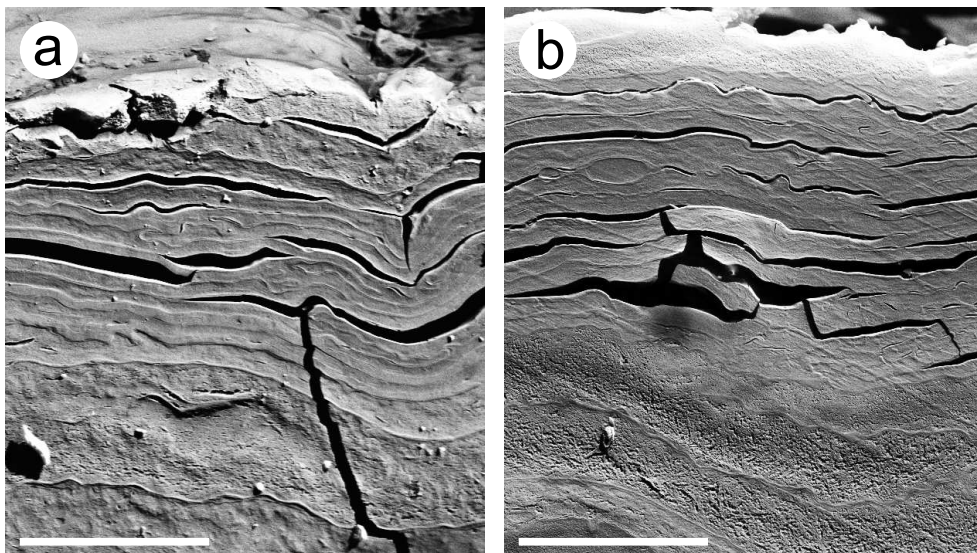


Abbildung 4.2: Risse als Artefakte im Stratum Corneum: a) bei zu starkem Ätzen des Wassers kollabiert das Gewebe großflächig und reißt auf. b) ein hochenergetischer Elektronenstrahl führt zu lokalen Verwerfungen und Rissen. Maßbalken: 5 μm

4.1.2 Morphologie des Stratum Corneums

Corneozyten der beiden untersten Schichten des Stratum Corneums waren stets sehr unregelmäßig in ihrer Form und von unterschiedlichem Querschnitt. Bei den plungetroffenen Proben bildeten sie zusätzlich – unabhängig von eventuell extern applizierten Medien – ein in Form und Größe (typischerweise 50 nm bis 300 nm, in den höheren Schichten meist deutlich unter 30 nm) stets charakteristisches Segregationsmuster aus. Dies alles erlaubte eine eindeutige Abgrenzung zu den Zellen des Stratum Granulosum (siehe auch Abschnitt 3.2.5 und insbesondere Abbildung 3.7 auf Seite 53). Zellen der höheren Stratum Corneum-Schichten bildeten eine geordnete Abfolge mit regelmäßiger Stapelung. Sie waren uniform und deutlich abgeflacht. In der gesamten Epidermis (und somit auch im Stratum Corneum) konnten regelmäßig Zell-Zell-Verbindungen in Form von Zellverklammerungen und Desmosomen nachgewiesen werden. In einer Probe mit vergleichsweise schlechtem Strukturerehalt konnten innerhalb der Corneozyten auch Intermediärfilamente dargestellt werden, die die Desmosomen miteinander verbinden (Abbildung 4.8c auf Seite 70). Eine Vermessung der Corneozytendicken war durchgängig möglich.

Insgesamt war im Stratum Corneum der Erhaltungszustand in Bezug auf mögliche Eisschäden bei plungetroffenen Proben mit dem der hochdruckgefrorenen vergleichbar: So sind die Segregationsmuster innerhalb der Corneozyten (außer bei Applikation von niederkonzentrierten Salzlösungen (0 % oder 5 %)) um Größenordnungen kleiner als die Dicke der jeweiligen Zelle (Abbildung 4.3). Um kleine Strukturdetails zu erhalten und ihr Kollabieren

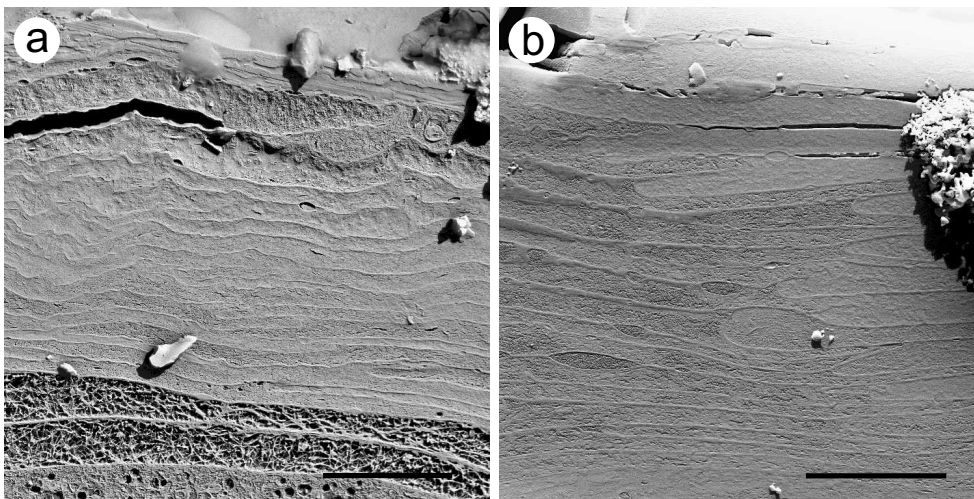


Abbildung 4.3: Gesamtmorphologie des Stratum Corneums: a) plungetroffene und b) hochdruckgefrorene Hautprobe. Die Maßbalken (jeweils 5 μm) befinden sich ungefähr auf Höhe des Übergangs vom Stratum Granulosum zum Stratum Corneum. [a] Oberarmhaut, weiblich, 73 Jahre, Behandlung: 12 Stunden Exposition gegenüber destilliertem Wasser bei 5 °C; b) Unterarmhaut, männlich, 41 Jahre, ambient]

zu vermeiden, wurde bewußt wenig Eis von der Probenoberfläche der hochdruckgefrorenen

Proben weggeätzt. Sie erschien daher meist kontrastarm und Spannungsrisse im Gewebe waren selten. Erst bei einem stärkeren Ätzen verstärkte sich auch der Kontrast – insbesondere der an den Zellgrenzen.

Bei sämtlichen gefriersubstituierten Proben waren die einzelnen Schichten des Stratum Corneums mehr oder weniger weit voneinander getrennt und hatten teilweise nur noch über die Desmosomen miteinander Kontakt (vergleiche Abbildung 4.4). Vom Stratum Granulosum

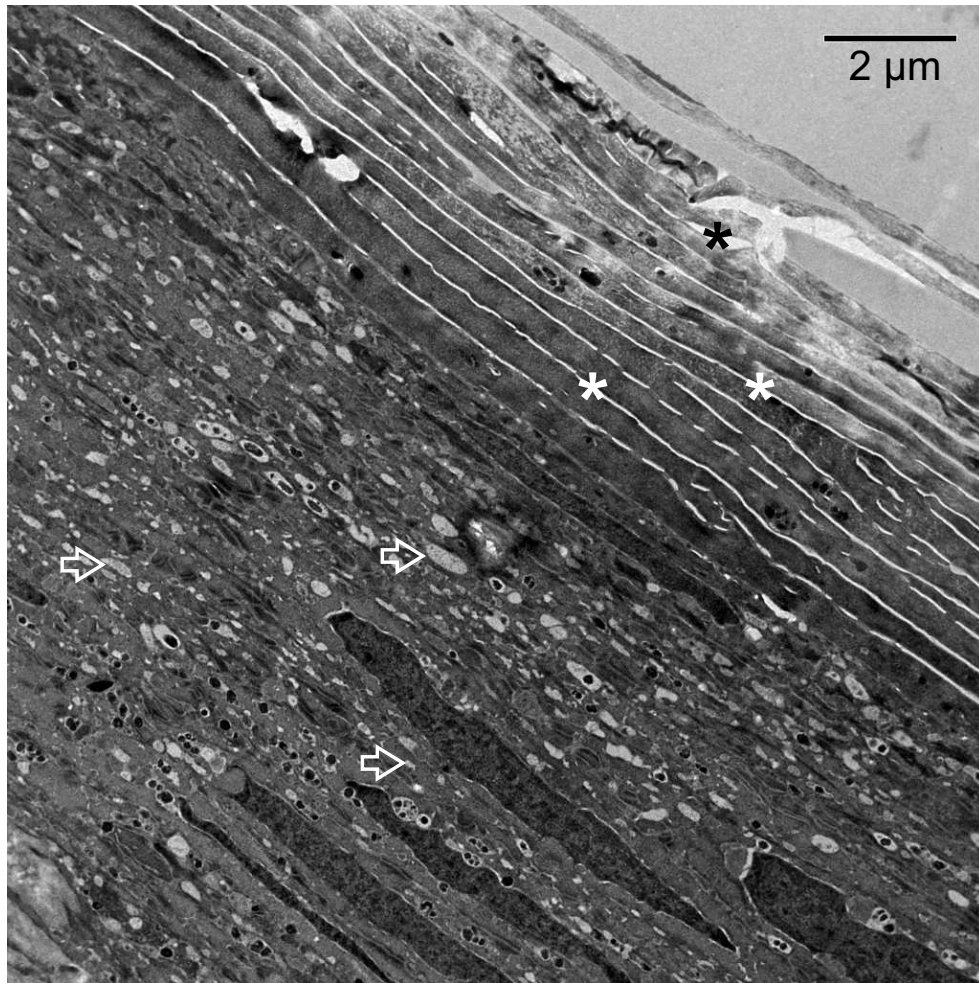


Abbildung 4.4: Das Stratum Corneum im Transmissionselektronenmikroskop: Während das Stratum Granulosum zahlreiche Vesikel (einige durch Pfeile markiert) aufweist, fehlen diese im darüberliegenden Stratum Corneum völlig. Es erscheint durch die Zellzwischenräume (*) aufgelockert. Meßbalken: 2 µm. [Gesichtshaut, weiblich, 60 Jahre, ambient]

konnte es klar differenziert werden durch das Fehlen von Vesikeln und die gleichmäßige Zellform. Lipidlamellen im Interzellularraum wurden nicht gefunden; Intermediärfilamente innerhalb der Corneozyten wurden hingegen regelmäßig dargestellt. Allerdings hing ihr Erhaltungsgrad wesentlich von der Gefrierqualität und dem Auftreten von Eiskristallen ab.

Meist ließ sich eine Vorzugsrichtung feststellen (Abbildung 4.5). Im Stratum Corneum

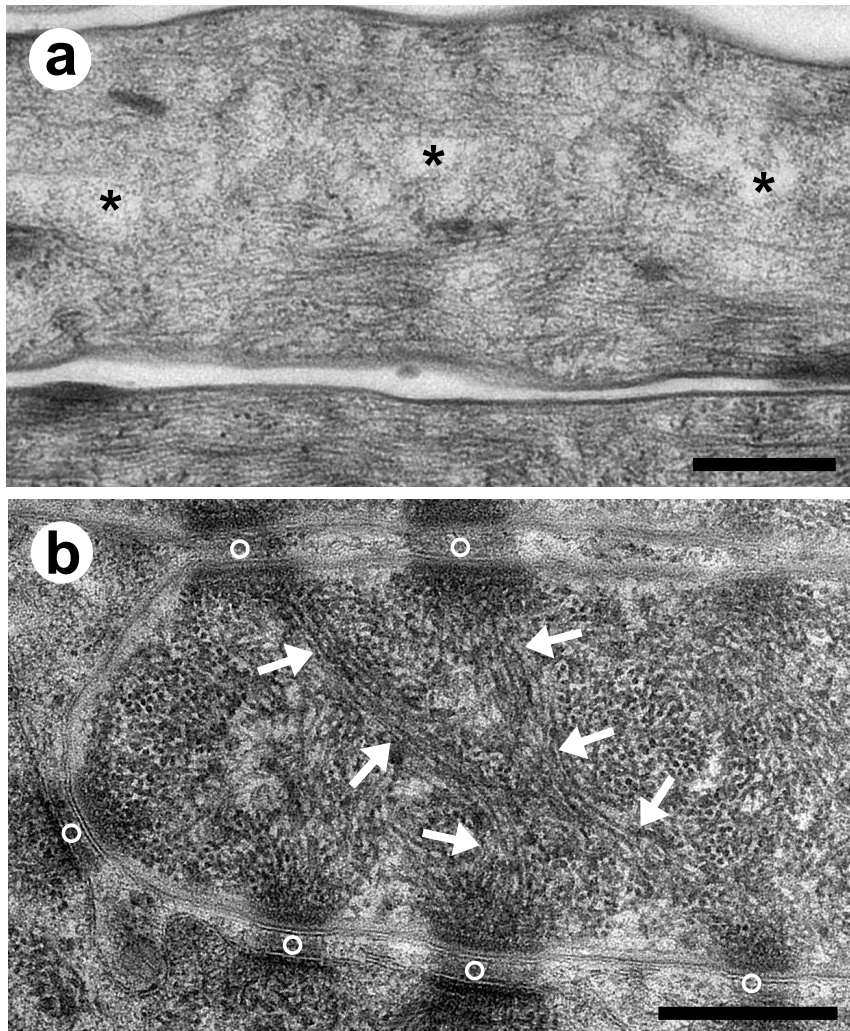


Abbildung 4.5: Stratum Corneum-Intermediärfilamente im Transmissionselektronenmikroskop a) Die Filamente haben hier eine Vorzugsrichtung parallel zum Corneozyten und damit zur Hautoberfläche. Durch die Entstehung kleiner isolierter Eiskristalle (*) wurde ihre Struktur zerstört. b) Ein Corneozyt mit Filamentfasern (Pfeile), die hauptsächlich senkrecht zur Hautoberfläche orientiert sind. Sie verbinden die Desmosomen (O) untereinander. Meßbalken: jeweils 200 nm; [a) Gesichtshaut, weiblich, 60 Jahre, ambient, hochdruckgefroren; b) Unterarmhaut, männlich, 36 Jahre, ambient, hochdruckgefroren, Bild mit freundlicher Genehmigung von Roger Wepf]

stellten sich die Desmosomen stets als mechanisch stabilste Strukturen heraus, denn selbst bei Proben mit Eisschäden oder Auswaschungen durch das HM20 waren sie strukturell klar zu identifizieren (Abbildung 4.5b). Allerdings zeigten meist nur Desmosomen der lebenden Schichten in der Epidermis (Stratum Granulosum, Stratum Spinosum, Stratum Basale) eine deutliche Feinstruktur und die zugehörigen Intermediärfilamente.

4.1.3 Morphologie der Epidermis und Dermis

Bei den plungegefrorenen Proben konnte die Dermis von der Epidermis sehr leicht anhand der unterschiedlichen Morphologie und der unterschiedlichen Segregationsmuster differenziert werden (vergleiche auch den schematischen Hautquerschnitt 2.1 auf Seite 5): Während die Dermis die charakteristischen Kollagenstrukturen aufwies, zeichneten sich in den Zellen der darüberliegenden Epidermis die Zellkerne aufgrund ihres hohen Wassergehaltes deutlich ab. Ihre Form war sehr charakteristisch für die einzelnen Schichten: Rechteckig aufrechtstehend im Stratum Basale, rund im Stratum Spinosum, abgeflacht im Stratum Granulosum und höchstens noch als Rest im Stratum Corneum (vergleiche Abbildung 4.6). Bei den hochdruckgefrorenen Proben fiel die Unterscheidungsmöglichkeit anhand der un-

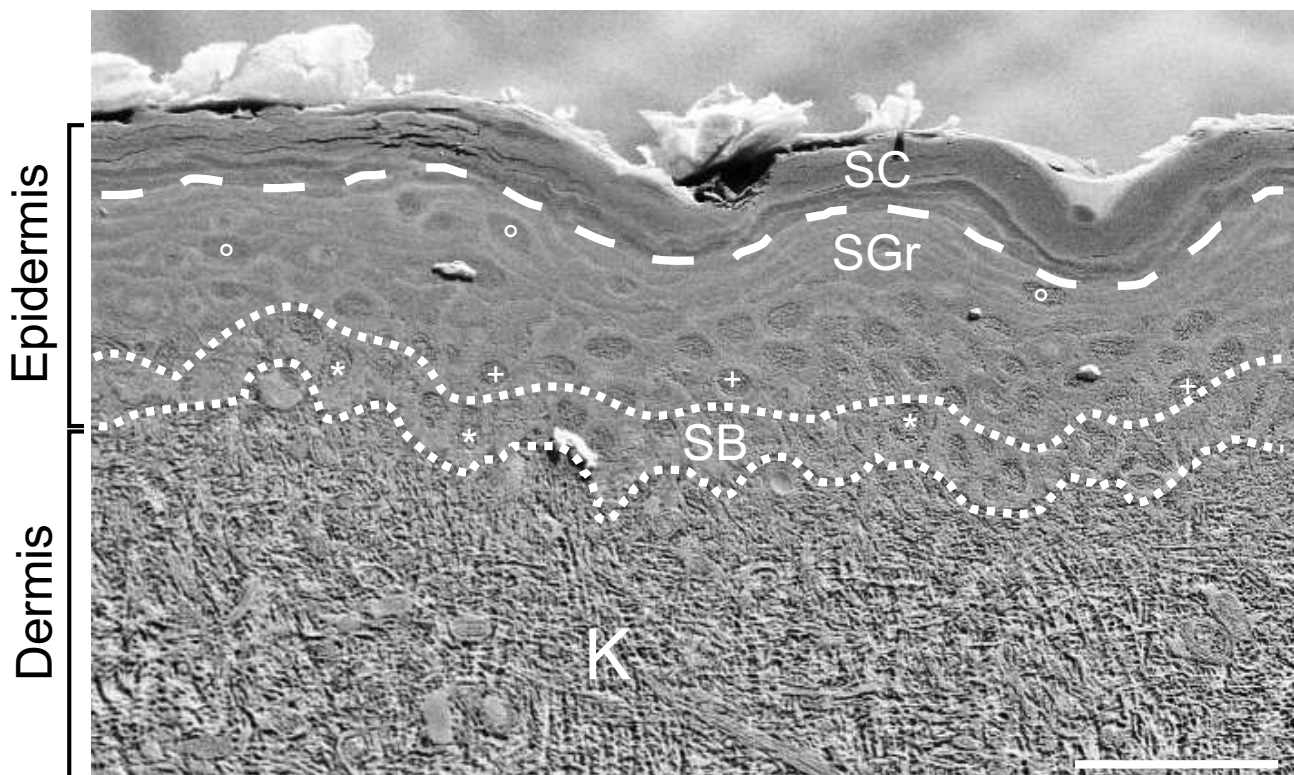


Abbildung 4.6: Morphologie der Epidermis in plungegefrorenen Proben. Aufgrund ihrer großen Segregationsmuster ist das Kollagen (K) der Dermis sowie die Zellkerne in der Epidermis deutlich zu erkennen. In dem Stratum Basale (SB), das aus einer einzelnen Zellschicht besteht (markiert durch die gepunkteten Linien) sind die Kerne meist rechteckig und aufrechtstehend (*), im darüberliegenden Stratum Spinosum kreisförmig (+) und im Stratum Granulosum (SGr) abgeflacht (o). Oberhalb des Überganges (gestrichelte Linie) zum Stratum Corneum (SC) kommen hingegen allenfalls Zellkernreste vor und es hat insgesamt einen anderen Kontrast. Meßbalken: 40 μm

terschiedlichen Segregationsmuster weg. Die Abgrenzung zwischen Dermis, Epidermis und Stratum Corneum erfolgte daher durch das Auftreten bzw. Fehlen von Zellkernen und Or-

ganellen (vergleiche beispielsweise Abbildung 4.8b auf der nächsten Seite). Auf Kollagen wird in einem gesonderten Kapitel 4.2.3 eingegangen.

Während der Gefriersubstitution offenbar schwierig zu erhalten waren die Lipide, da auch im Stratum Granulosum kleine Lipidlamellen im Interzellularraum dargestellt nachgewiesen werden konnten, doch fanden sich durchgängig bis zur letzten Schicht Vesikel, die mit Lipidstapeln gefüllt sind. Insbesondere ihre Exozytose in den Interzellularraum konnte regelmäßig dargestellt werden (vergleiche Abbildung 4.7).

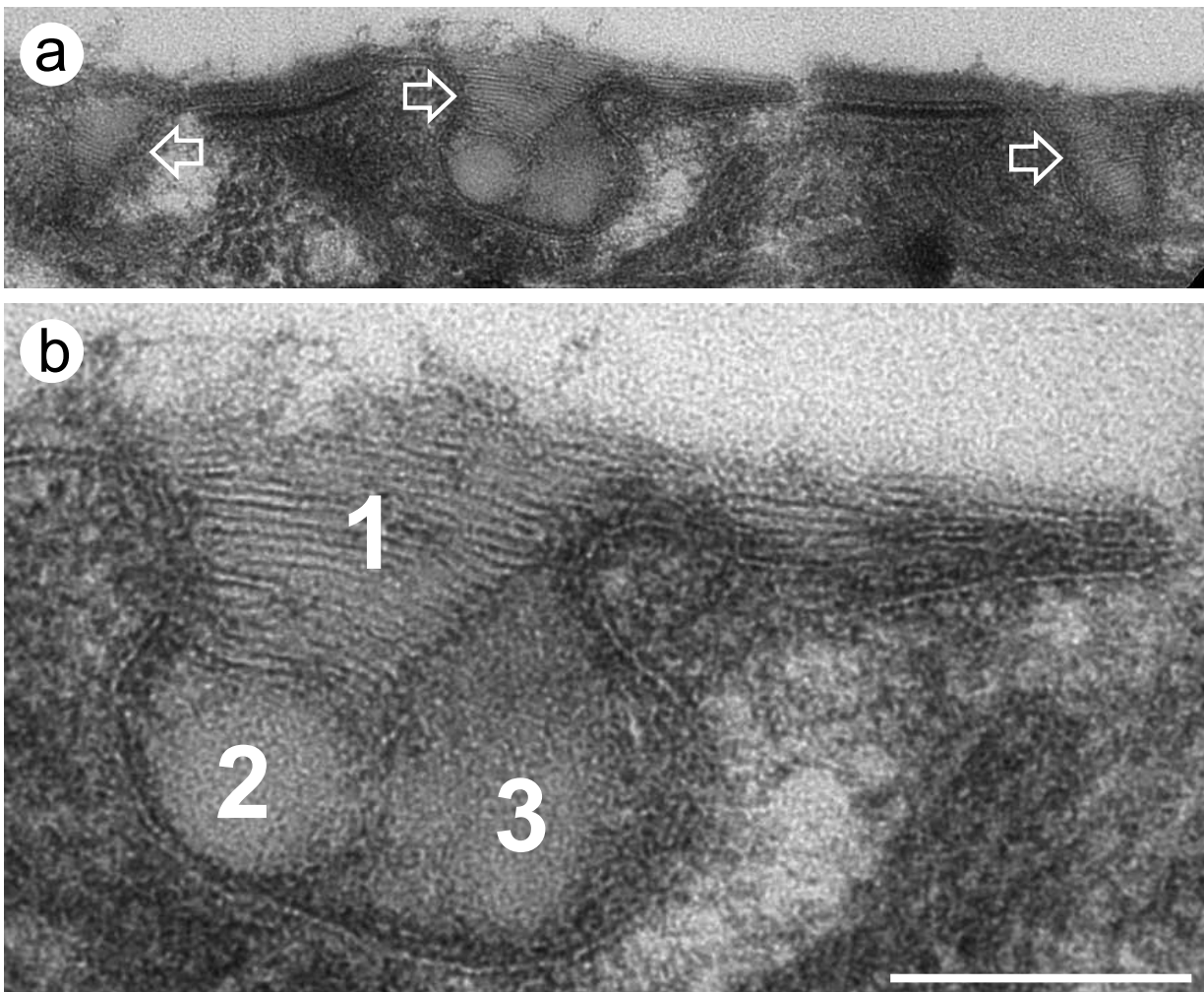


Abbildung 4.7: Lipidexozytose in der obersten Stratum Granulosum-Schicht a) Ausschnitt aus der Zellmembran mit drei gleichzeitig stattfindenden Lipidexozytosen in den Interzellularraum (Pfeile). b) Detailvergrößerung einer multivesikulären Exozytose (Vesikel 1-3), in der die homogene Stapelung der Lamellen klar zu erkennen ist (Abstand in diesem Vesikel ungefähr $7,2 \pm 1,5$ nm). Maßbalken: 150 nm. [Oberarmhaut, weiblich, 63 Jahre, ambient, hochdruckgefroren]

Der Basalbereich zeigte meist den besten Strukturerhalt (Abbildung 4.9a auf Seite 71): Die

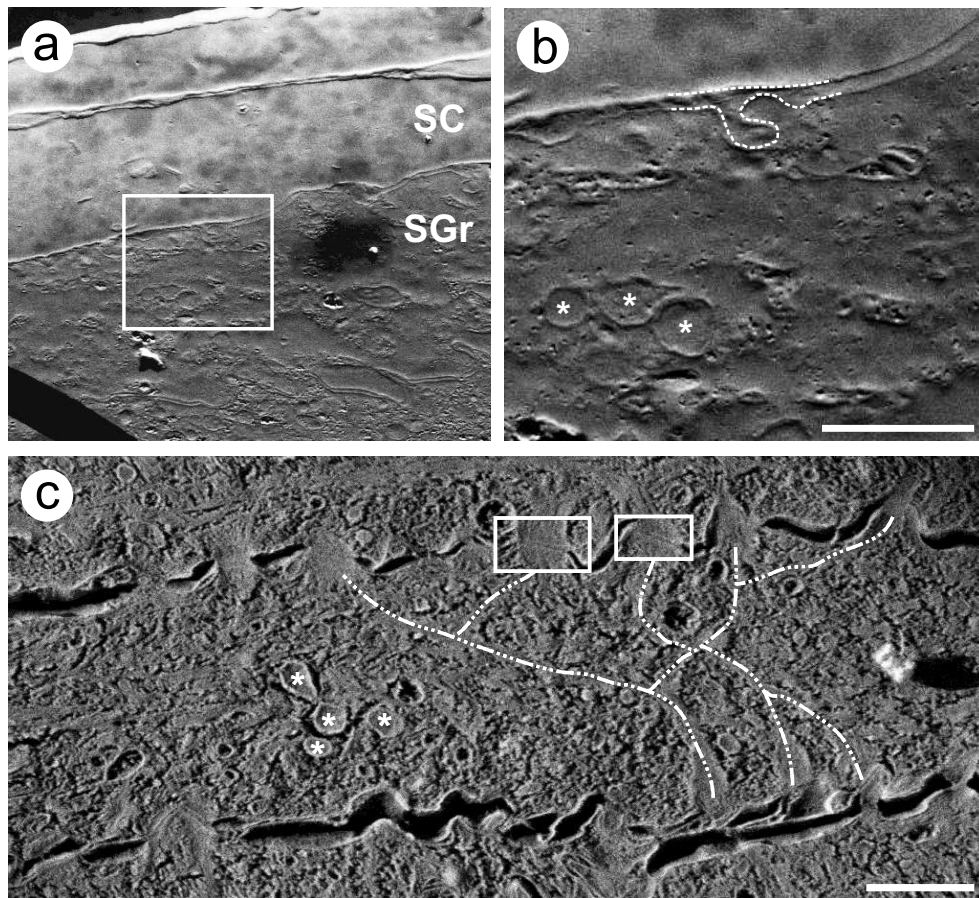


Abbildung 4.8: Zelluläre Substrukturen in hochdruckgefrorenen Proben : a) Übergangsbereich vom Stratum Granulosum (SGr) zum Stratum Corneum (SC). Deutlich zu erkennen sind die begrenzenden Membranen der einzelnen Zellen. In der Teilvergrößerung (b) sind einzelne intrazelluläre Vesikel (*) sowie eine Exocytose in den Interzellularraum (gestrichelte Linie) zu erkennen. c) In einer stark gefriergeätzten und durch Eisschäden weniger gut erhaltenen Probe sind zwar kleinere Strukturen innerhalb des Stratum Corneum zerstört. Vesikel (*) und durch die Zelle verlaufende Intermediärfilamente (gepunktete Linie) bleiben jedoch erhalten. Sie verbinden die ebenfalls erkennbaren Desmosomen (Rechtecke). Meßbalken: (b): 500 nm; (b): 1 μ m.

[a,b) Unterarmhaut, männlich, 41 Jahre, hochdruckgefroren; c) Brusthaut, weiblich, 59 Jahre, hochdruckgefroren]

Basalmembran als untere Begrenzung der Epidermis konnte in weiten Teilen ihres Verlaufes dargestellt werden. Eisartefakte in der relativ wasserhaltigen Dermis darunter waren in ihren Ausmaßen meist örtlich eng begrenzt. Die einzelnen Fasern wiesen regelmäßig die charakteristische Querstreifung (4.9b) auf und zeigten wenig Zerstörung oder Agglomeration.

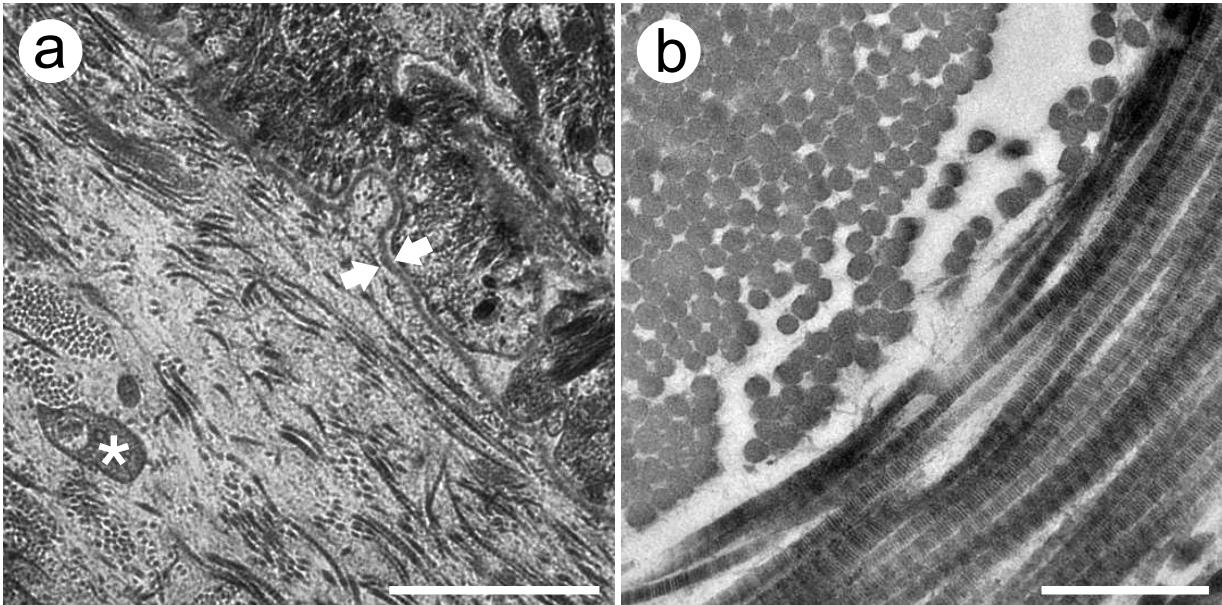


Abbildung 4.9: Basalbereich im Transmissionselektronenmikroskop: a) Deutlich zu erkennen ist die Basalmembran (zwischen den Pfeilen) und ein membranumschlossener Bereich mit einer vesikulären Struktur im Inneren (*), der wahrscheinlich der Ausläufer eines Fibroblasten ist. Ferner ist Kollagen in Bündeln und als Einzelstränge sichtbar. b) Kollagen längs- und querschnittlich, wobei insbesondere die periodische Querstreifung deutlich erkennbar ist. Meßbalken: (a) 2 μm ; (b) 500 nm.

4.2 Darstellung weiterer Hautstrukturen

In diesem Kapitel werden Strukturdetails der Haut und ihrer Anhangsgebilde beschrieben. So ist es auch möglich, von Haaren als sehr rigiden Strukturen und einzelnen Fettzellen als weichen Strukturen im gefrorenen Zustand samt dem sie umgebenden Gewebe Querschnitte anzufertigen. Am Kollagen kann die Gefrierqualität bei sehr wasserhaltigen Strukturen kontrolliert werden; seine periodische Unterstruktur erlaubt zusätzlich eine Gesamtbeurteilung der Auflösung und Präparation. Zudem erlaubt es einen Vergleich der rasterelektronenmikroskopischen mit den transmissionselektronenmikroskopischen Bildern. Schließlich konnte im Rasterelektronenmikroskop auch die Oberflächenstruktur von Corneozyten sowie die präparierte Querschnittkante abgebildet werden, was ergänzende Informationen zu den bereits vorgestellten Ergebnissen liefert. Die folgenden Abschnitte zeigen diese Ergebnisse an exemplarischen Bildern.

4.2.1 Haar

Abbildung 4.10 auf Seite 73 demonstriert, daß auch ganze Hautanhangsgebilde querschnittlich werden können. Die unterschiedlichen Dichten und der unterschiedliche Wassergehalt der beteiligten Strukturen (Haar, Talg, Epidermiszellen) in unmittelbarer Nähe

zueinander scheinen dabei keinen wesentlichen Einfluß auf die Schnittqualität zu haben. In der Detailvergrößerung in Abbildung 4.10a sind deutlich die einzelnen Cuticula-Schichten der Haaraußenseite zu erkennen. Auch die Cortexzellen im Inneren des Haares sind bei höheren Auflösungen zu identifizieren. Nur bei dem Querschnitt der Zellen des Ausführungsganges (4.10b) sind kleine Zellfragmente herausgebrochen. An der Oberfläche der zurückbleibenden Zellen finden sich noch die interzellulären Lipide (4.10c).

4.2.2 Fettzellen

Nicht nur von Strukturen, die härter sind als das Stratum Corneum (wie beispielsweise Haare), sondern auch von gefrorenen Strukturen, die wesentlich weicher sind, wurden mittels der vorgestellten Präparationstechnik homogene Querschnitte angefertigt. So zeigen Fetttröpfchen in der Dermis keine Stauchungen oder Risse – einzig Scharten des Messers hinterlassen schwache Spuren auf der präparierten Oberfläche (vergleiche Abbildung 4.11 auf Seite 74). Die Risse in der Dermis verlaufen in Schnittrichtung, sodaß sie wahrscheinlich auf das Ätzen in der Gefrierätzanlage zurückzuführen sind, nicht aber auf Zerstörungen durch die Messerbewegung, die eher zu Stauchungen und Rissen senkrecht zu dieser Richtung führen würden. Weder Material der Dermis noch der Fetttröpfchen wurde in die jeweils andere Struktur verschmiert. Die plungegefrorenen Proben wurden nur mit dem Trimmdiamanten geschnitten, der neben einer vorderen Schneide auch je eine Seitenschneide rechts und links im Winkel von 135° besitzt. Wie in Abbildung 4.11 zu sehen ist, lassen sich saubere Oberflächen auch mit den Seitenschneiden präparieren. Die Ecke, an der sie mit der vorderen Schneide zusammentrifft, erzeugt eine scharfe Linie im Probenmaterial (4.11c).

4.2.3 Kollagen

Als Teil der wasserreichen extrazellulären Matrix wird Kollagen mit dem Plungegefrieren nur unzureichend gefroren, denn durch die sich bildenden Eiskristalle werden die einzelnen Fasern zusammengeschoben, sodaß eine aufgelockerte Struktur mit großen Hohlräumen zurückbleibt (siehe Abbildung 4.12a auf Seite 75). In den Hohlräumen hingegen, die die Eiskristalle beim Einfrieren geschaffen haben, läßt sich bei höheren Vergrößerungen noch sehr leicht die Periodizität auflösen (Abbildung 4.12b).

Bei hochdruckgefrorenen Proben stellt sich die extrazelluläre Matrix mit dem Kollagen als eine sehr kompakte und homogene Struktur dar. Insbesondere fehlen die großen Hohlräume, die regelmäßig bei den plungegefrorenen Proben auftreten. Auch die unterschiedlichen geometrischen Orientierungen der Bündel sind einfach identifizierbar (Abbildung 4.13a auf Seite 76). Sind diese quer angeschnitten, so zeichnen sich deutlich einzelne Fibrillen ab. Eine Auflösung der Periodizität in Längsrichtung auf der präparierten Oberfläche gelang aber nur auf kurzen Abschnitten der Fasern (Markierungen in 4.13b). Waren aber Teile herausgebrochen, so zeigten die darunterliegenden Kollagenfasern sehr deutlich in Längsrichtung ihre charakteristische Periodizität: Beispielsweise aus Abbildung 4.13c zu (64 ± 4) nm.

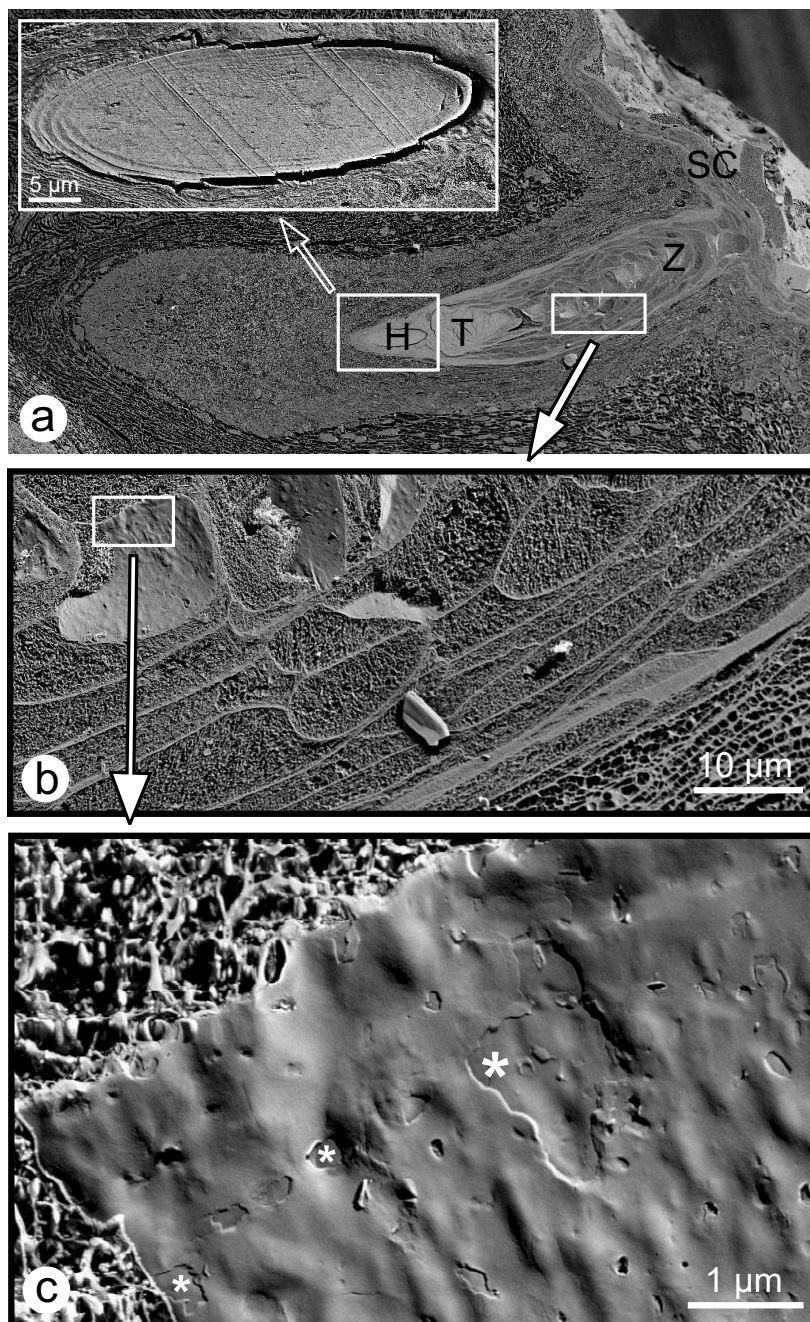


Abbildung 4.10: (a) Angeschnittenes Haar (H) und Ausgang einer Talgdrüse (T). Die Zellen (Z) des Ausführungsganges des Haares und der Talgdrüse gehen kontinuierlich in das Stratum Corneum (SC) der Hautoberfläche über; (b) Detailvergrößerung dieser Zellen. Eine Ansicht der Außenstruktur (c) einer Zelle erhält man, wenn Teile herausgebrochen waren. Dabei wurden vielfach auch kleine Teile der interzellulären Lipide entfernt, wodurch eng umgrenzte Vertiefungen zurückblieben (*).
 [Oberarmhaut, weiblich, 49 Jahre, Behandlung: 12 Stunden Exposition gegenüber Vaseline bei 5 °C]

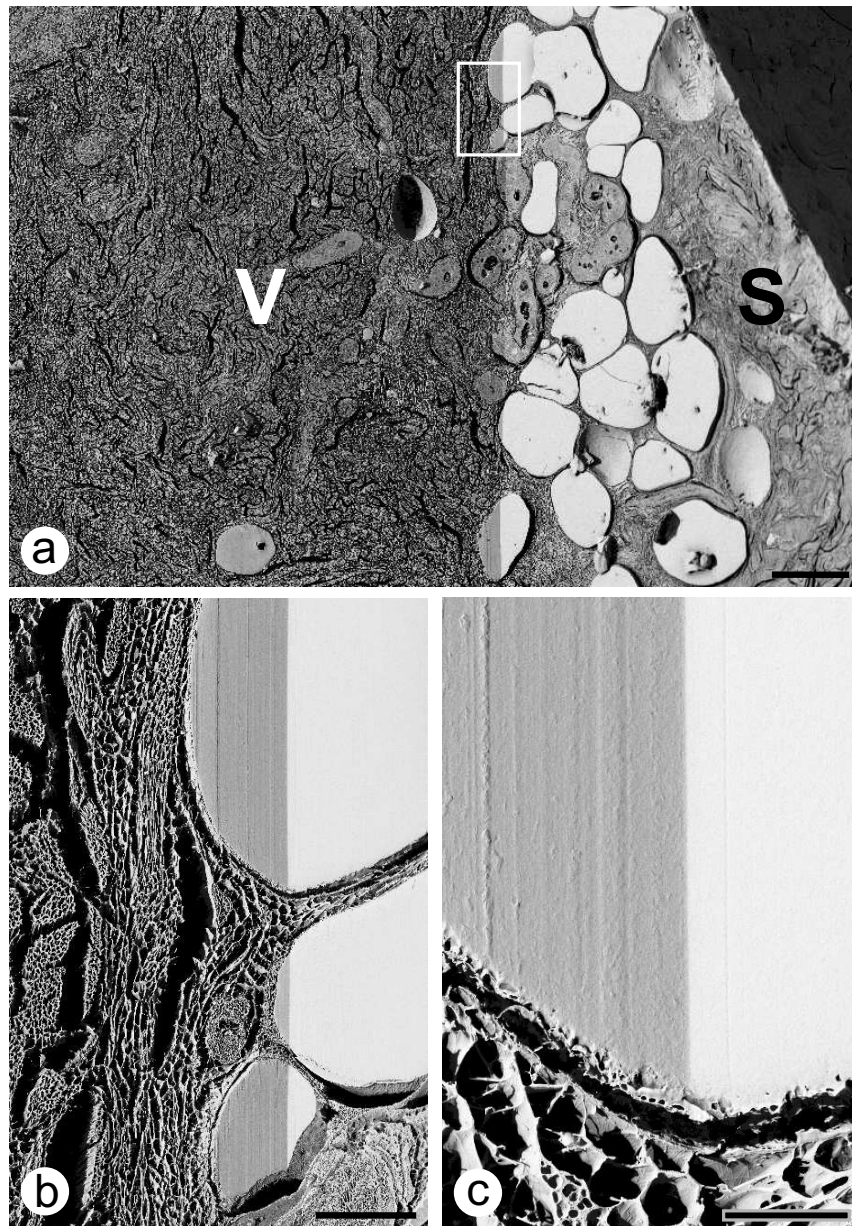


Abbildung 4.11: Angeschnittene Fettzellen in der Dermis: (a): Durch die Vorderseite und die Seite des Diamantmessers werden zwei Oberflächen präpariert, die zueinander einen Winkel von 135° haben (durch "V" bzw. "S" markiert). Der Helligkeitsunterschied ergibt sich aus der unterschiedlichen Neigung relativ zum Elektronendetektor. Die Dermis zeigt durch ihren hohen Wassergehalt bei plungetroffenen Proben große Segregationsmuster. Darin enthaltene Fetttröpfchen hingegen werden ohne sichtbare Artefakte gefroren (im Rahmen der verwendeten Auflösung des Rasterelektronenmikroskops). (b) und (c): Vergrößerungen des in (a) markierten Bereiches. Maßbalken: (a): $100\ \mu\text{m}$; (b): $20\ \mu\text{m}$; (c): $5\ \mu\text{m}$. [Oberarmhaut, weiblich, 73 Jahre, Behandlung: 12 Stunden Feuchtekammer bei 5°C]

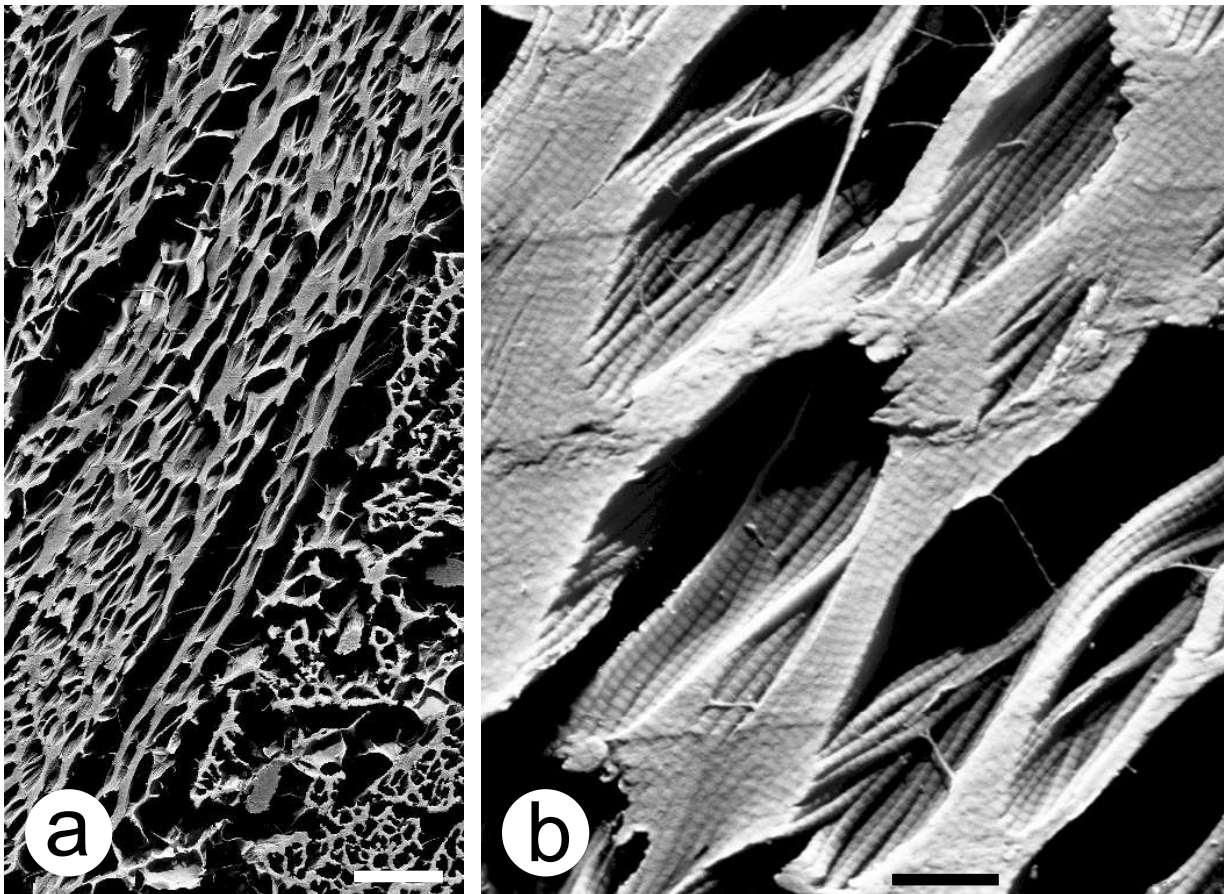


Abbildung 4.12: Kollagen in plungegeforenen Proben: Der hohe Wassergehalt des Kollagen, verbunden mit der begrenzten Kühlrate des Plungegefrierens bewirkt große Segregationsmuster in den Kollagenbündeln (a). Die einzelnen Fasern werden zusammengeschoben, sind aber in ihrer Feinstruktur und Periodizität trotzdem noch darstellbar (b). Meßbalken: (a)=5 µm; (b)=500 nm; [Oberarmhaut, weiblich, 73 Jahre, Behandlung: 12 Stunden Exposition gegenüber 10%iger Kochsalzlösung bei 5 °C]

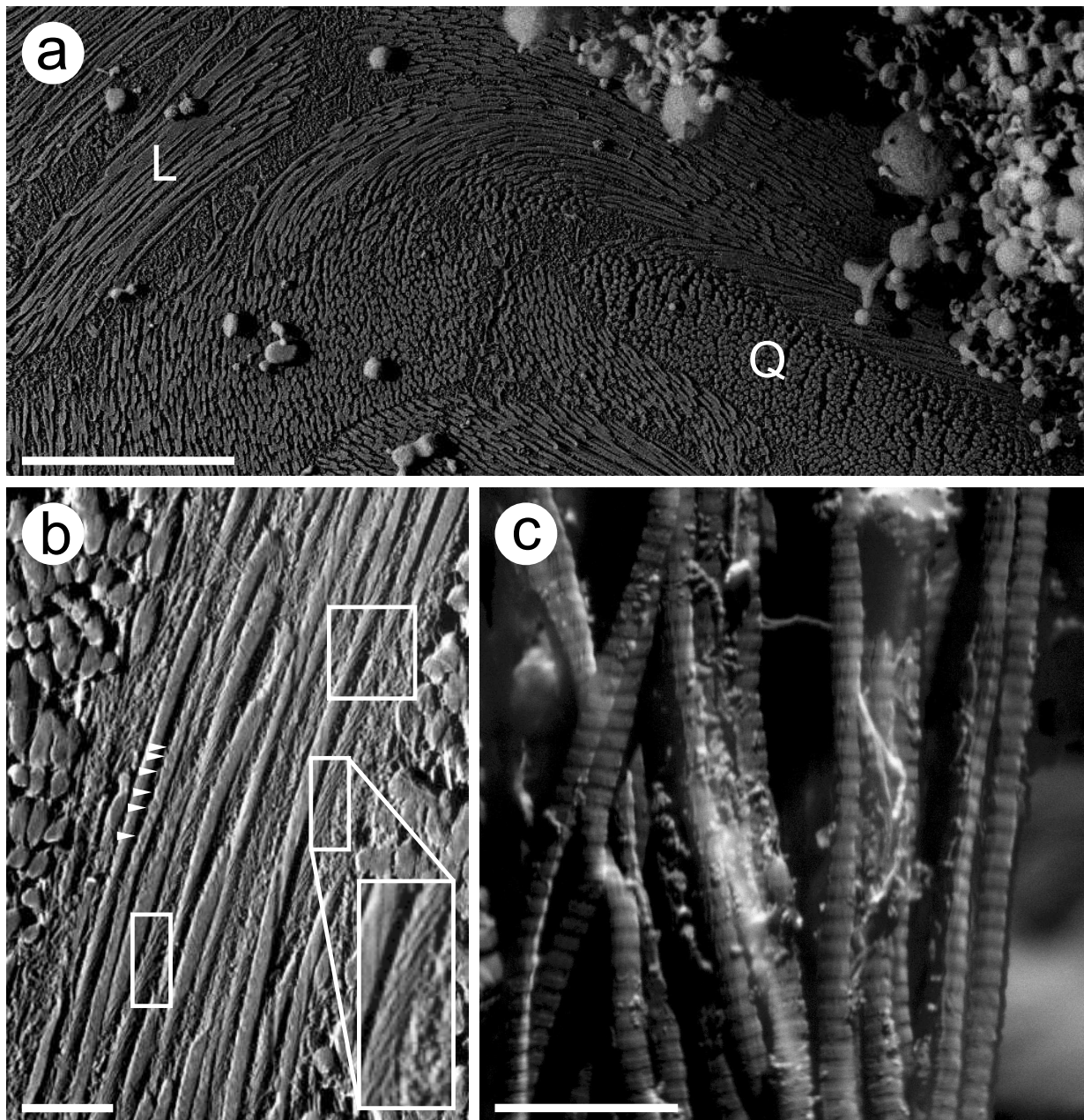


Abbildung 4.13: Kollagen in hochdruckgefrorenen Proben stellt sich sehr kompakt und ohne Hohlräume dar (a). Deutlich waren längs- (L) und querschnittene (Q) Bündel erkennbar. b) In längsgeschnittenen Bündeln waren zwar einzelne Kollagenfibrillen eindeutig auflösbar, allerdings war ihre periodische Struktur nur ausnahmsweise erhalten (kleine weiße Pfeile). Manchmal schien sich hingegen eine innere, fädige Struktur der einzelnen Fibrillen zu zeigen (Rechtecke). c) An Stellen hingegen, an denen aus der Oberfläche Material herausgebrochen war, war die periodische Substruktur der Fibrillen klar zu erkennen. Maßbalken: (a)=5 µm; (b),(c)=500 nm; [Unterarmhaut, männlich, 43 Jahre, ambient]

4.2.4 Oberflächenstruktur von Corneozyten

Bei der Präparation einer hochdruckgefrorenen Hautprobe wurde ein Teil des Stratum Corneum im Vakuum abgerissen und umgedreht, sodaß auf diese Weise auch die Oberflächenstruktur der Corneozyten abgebildet werden konnte: Sie bilden einen dichten Verband ohne Zwischenraum aber mit großem Überlapp untereinander. Die Oberfläche zeigt häufig teils ein lineares Texturmuster und teils ein punktförmiges (4.14b auf der nächsten Seite). Es lassen sich allerdings keine lokalen Verdickungen durch Zellkernfragmente identifizieren; sie sind ungefähr ab der vierten Stratum Corneum-Schicht vollständig abgebaut. Die hier freigelegten Corneozyten scheinen daher aus dem mittleren oder oberen Stratum Corneum zu stammen. Zudem zeigten diese Aufnahmen, daß die durch das Diamantmesser präparierte Schnittkante quer durch die einzelnen Corneozyten verlief, ohne daß die Ränder ausgefranst oder sonst mechanisch beschädigt erschienen. Nur an einer Stelle war ein Corneozyt teilweise hochgebogen (Markierung in 4.14b), sodaß man dadurch einen Eindruck von seiner geringen Dicke, bezogen auf seine Fläche, bekommt. Ebenfalls erkennt man den Abdruck von Corneozyten der nächstfolgenden Schicht (4.14c).

4.3 Morphologie des Stratum Corneums bei definierter Hydratation

An die eher phänomenologischen Beschreibung der allgemeinen Hautmorphologie zu Beginn dieses Kapitels schließen sich nun die Morphologieveränderungen durch externe Hydratation im Stratum Corneum für das Haupt-, Kontroll- und Glycerinexperiment jeweils in graphischer Form an (Abschnitt 4.3.2 bis 4.3.4). Die plunzegefrorenen Proben zeigten zwar aufgrund ihrer begrenzten Gefrierqualität in den lebenden Schichten der Haut deutliche Eisschäden; für das Stratum Corneum allerdings war die Qualität ausreichend. Diese Proben erlaubten aufgrund ihrer Größe (vergleiche Abbildung 4.15 auf Seite 79) nicht nur eine Beschreibung der Gesamtmorphologie des Stratum Corneums in verschiedenen Hydratationszuständen, sondern auch eine statistische Erhebung der Dicken von jeder Schicht. Insbesondere ließ sich damit ein ausreichender Probendurchsatz sicherstellen. Daher wurden ausschließlich plunzegefrorene Proben für die Untersuchung des Hydratationszustandes verwendet. Um diesen nicht zu verändern, wurden sie nicht gefriersubstituiert, sondern ausnahmslos cyopräpariert. Hingegen wären Cryodünnschnitte für die Transmissionselektronenmikroskopie zu strahlsensitiv, um eine adäquate Auswertung zu erlauben. Zudem wäre ihre Präparation zu zeitaufwendig und könnte den nötigen Probendurchsatz nicht gewährleisten.

4.3.1 Allgemeine Morphologie

Applikation von 0%iger oder 5%iger Kochsalzlösung Bei Applikation von niedrigkonzentrierten (0% und 5%) Salzlösungen für 12 Stunden wurde der Zusammenhalt im Stratum Corneum so stark gestört, sodaß es schon bei kleinen externen mechanischen

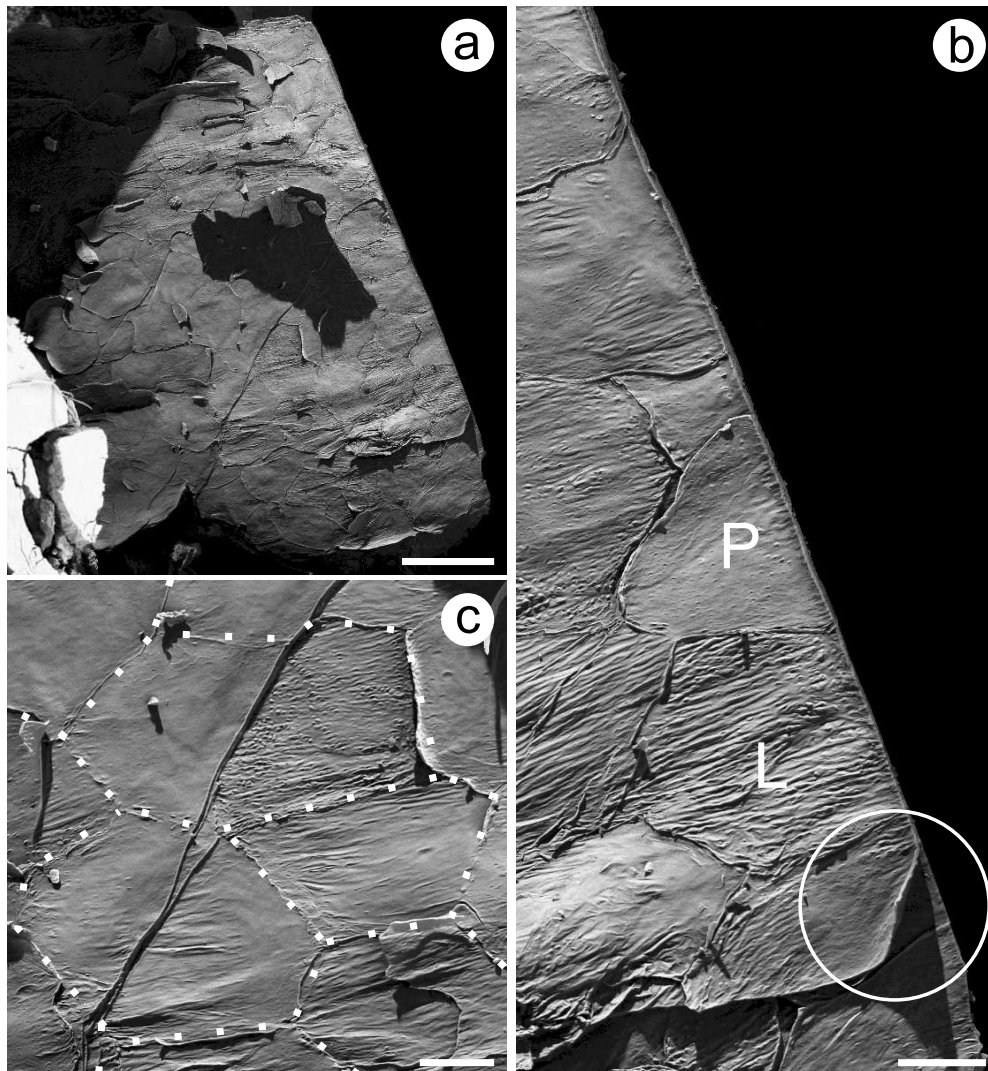


Abbildung 4.14: Oberflächenstruktur von Corneozyten: (a): Übersicht. Der große Schatten in der Mitte resultiert aus aufgestellten Corneozyten und der Bedampfung mit einem Schwermetall aus flachem Winkel (vergleiche Abschnitt 3.2.3 ab Seite 50). (b): die präparierte Schnittfläche durch das Stratum Corneum sowie ein teilweise hochgeklappter Corneozyt (Markierung). Auf der Oberfläche der anderen Corneozyten sind lineare (L) und punktförmige (P) Texturen zu sehen. (c) Abdrücke von der nächsten Stratum Corneum-Schicht (gestrichelt).

Meßbalken: (a)=50 µm; (b),(c)=10 µm; [Bauchhaut, weiblich, 34 Jahre, Behandlung: 12 Stunden Exposition gegenüber 15 %iger Kochsalzlösung bei 5 °C]

Kräften auseinanderbrach und nur die untersten Schichten zurückblieben. Zudem kam es dabei zwischen den Schichten des Stratum Corneum stets zur Ausbildung von linsenförmigen Wassereinschlüssen (im folgenden Wasserkavitäten genannt) mit einer Länge zwischen 3 µm und 25 µm und einer Höhe zwischen 2 µm und 20 µm. In ihrem Innern fanden sich

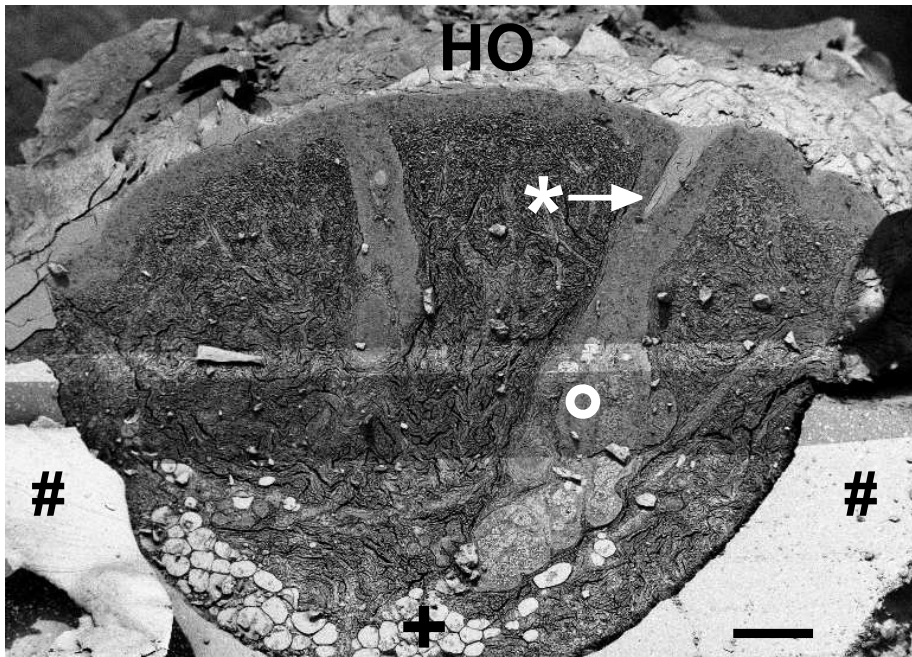


Abbildung 4.15: Querschnitt einer Hautstanze im Elektronenmikroskop mit Hautoberfläche (HO), Haar (*); Drüse (o) und Fettzellen (+). Von der wasserundurchlässigen Außenschicht (in diesem Fall ein Plastikschauch) wurde ebenfalls ein Querschnitt angefertigt (#). Meßbalken: 200 nm

häufig noch Eintrocknungsspuren (vergleiche Abbildung 4.16 auf der nächsten Seite). Die Desmosomen konnten der Ausbildung dieser Kavitäten offenbar nur begrenzt Widerstand entgegensetzen, während sich die Verhakungen der Corneozyten erstaunlich stabil zeigten und nur selten auseinandergerissen wurden (Abbildung 4.17 auf Seite 81).

Applikation von Glycerin Das Stratum Corneum zeigte sich sowohl nach 2 wie auch nach 6 Stunden Behandlung mit Glycerin sehr kompakt und ohne ausgeprägte Segregationsmuster. Selbst in den untersten Schichten, in denen sich sonst (wie vorher beschrieben) stets große Eiskristalle gebildet haben, waren die Segregationsmuster vergleichsweise klein oder (bei den verwendeten Auflösungen) überhaupt nicht sichtbar, während das Stratum Granulosum hingegen den bekannten Erhaltungszustand zeigte. Nach 6 Stunden Exposition zeigen sich weiterhin zwischen den Schichten des Stratum Corneums Einlagerungen (vergleiche Abbildung 4.18 auf Seite 82). Im Gegensatz zu den Kavitäten bei Exposition gegenüber destilliertem Wasser sind diese aber nach dem Ätzen in der Gefrierätzanlage nicht leer, sondern erscheinen noch immer gefüllt.

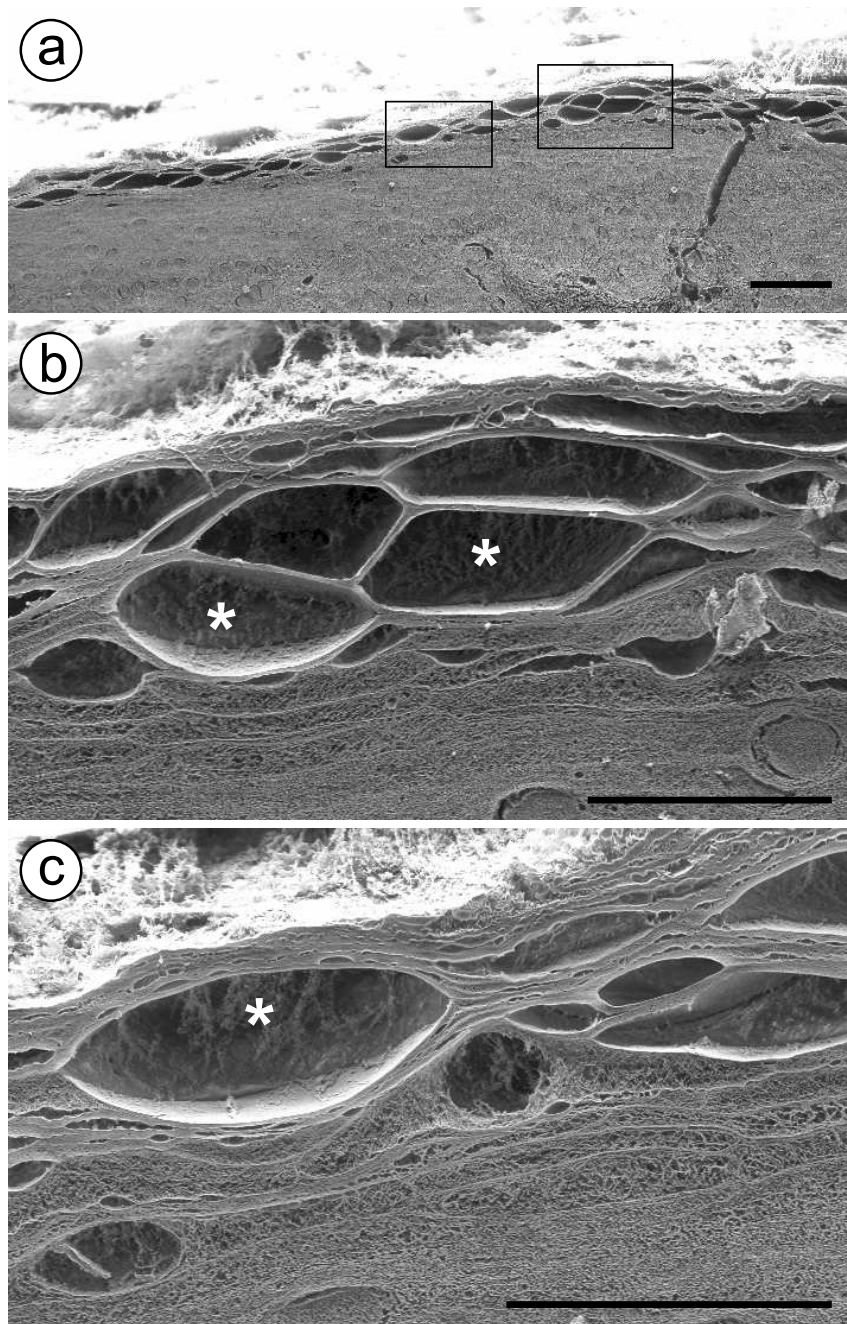


Abbildung 4.16: Wasserkavitäten im Stratum Corneum nach Exposition gegenüber destilliertem Wasser (a) sowie Nahaufnahmen (b und c). Im Inneren sind Eintrocknungsspuren (*) sichtbar. Maßbalken: (a): 50 μm ; (b)(c): 25 μm .

[Gesichtshaut, weiblich, 53 Jahre. Behandlung: 12 Stunden Exposition gegenüber destilliertem Wasser.]

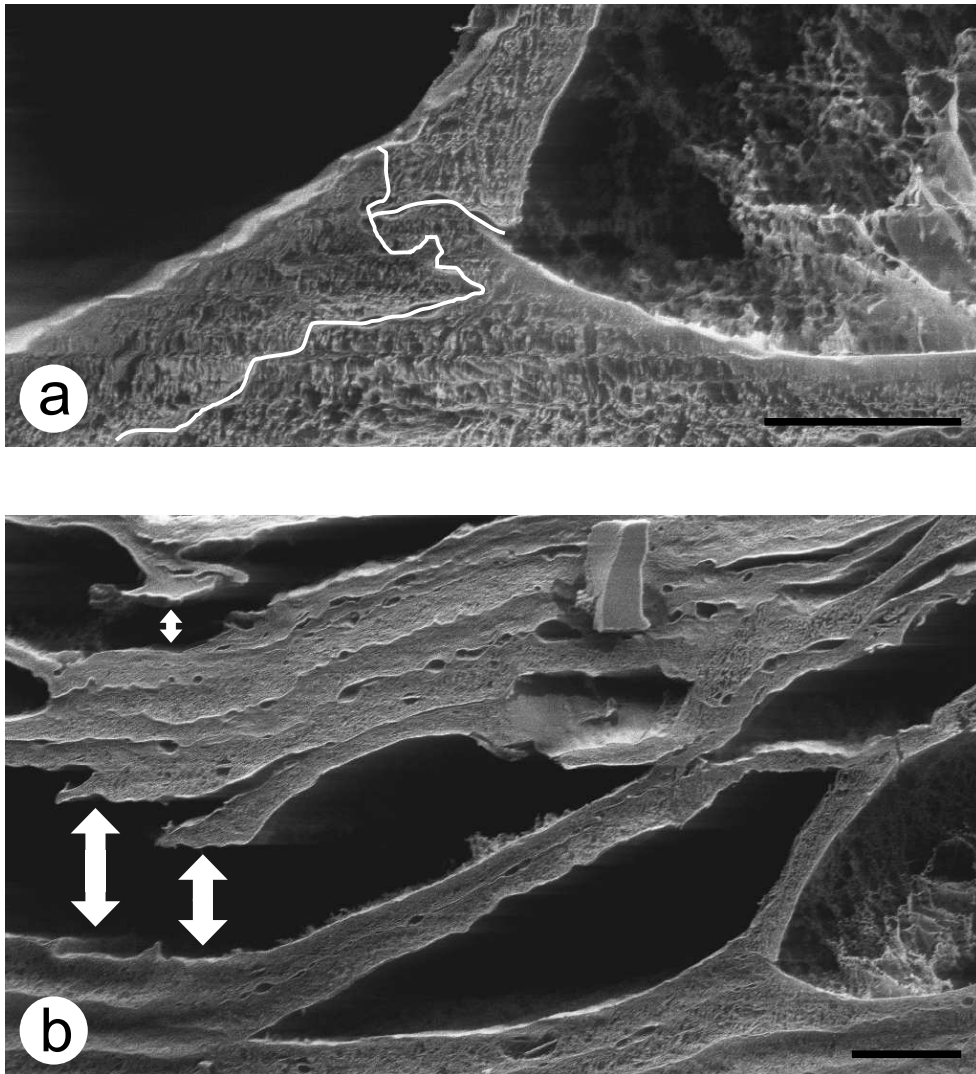


Abbildung 4.17: Corneozytenverhakungen nach Exposition gegenüber destilliertem Wasser werden mechanisch stark belastet (a; Zellgrenzen sind markiert) und geben dieser Belastung schließlich nach (Pfeile in b). Meßbalken: (a): 4 μm ; (b): 2 μm .

[Gesichtshaut, weiblich, 53 Jahre. Behandlung: 12 Stunden Exposition gegenüber destilliertem Wasser.]

4.3.2 Morphologieveränderungen im Hauptexperiment

Abbildung 4.19 auf der nächsten Seite zeigt die Veränderung der Morphologie des Stratum Corneums bei den verschiedenen Quellversuchen: Die Schichtung und Dickenverteilung in der Feuchtekkammer (4.19a) ist sehr homogen. Bei Zugabe von destilliertem Wasser verdicken sich die Corneozyten, während sie bei Zugabe von 15 % NaCl (4.19c) in der Mitte des Stratum Corneums teilweise sogar dünner zu sein scheinen als bei Referenzbehandlung. Genauerem Aufschluß gibt Abbildung 4.20 auf Seite 83, in der für alle Behandlungen die

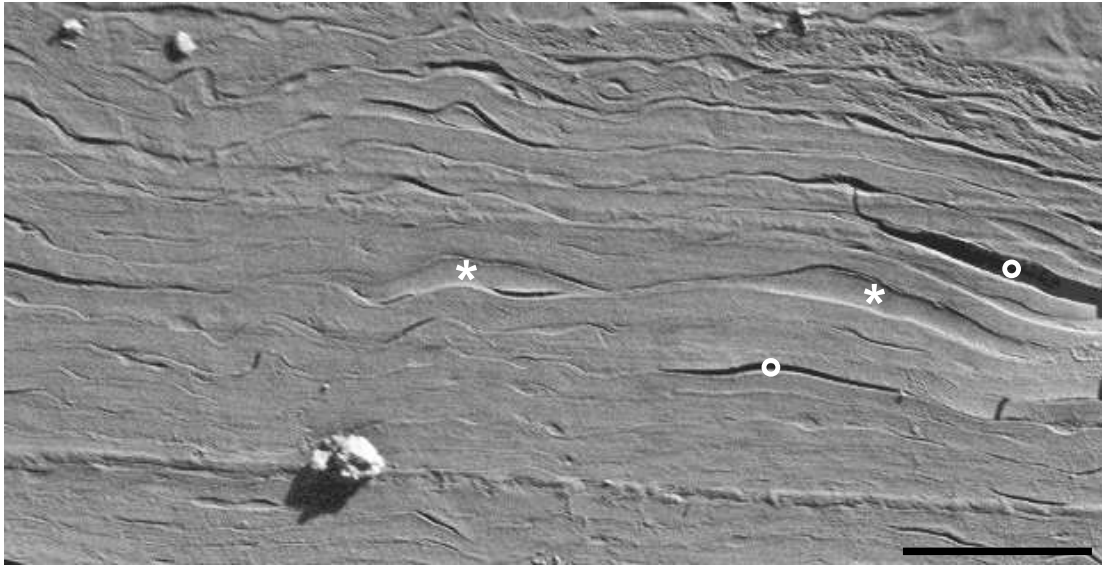


Abbildung 4.18: Morphologie des Stratum Corneums nach Glycerinexposition für 6 Stunden: Neben Rissen (o) durch das Ätzen und den Elektronenstrahl gibt es zwischen den Schichten des Stratum Corneums auch Einlagerungen, die nach der Präparation gefüllt bleiben (*). Meßbalken: 2 μm . [Gesichtshaut, weiblich, 60 Jahre]

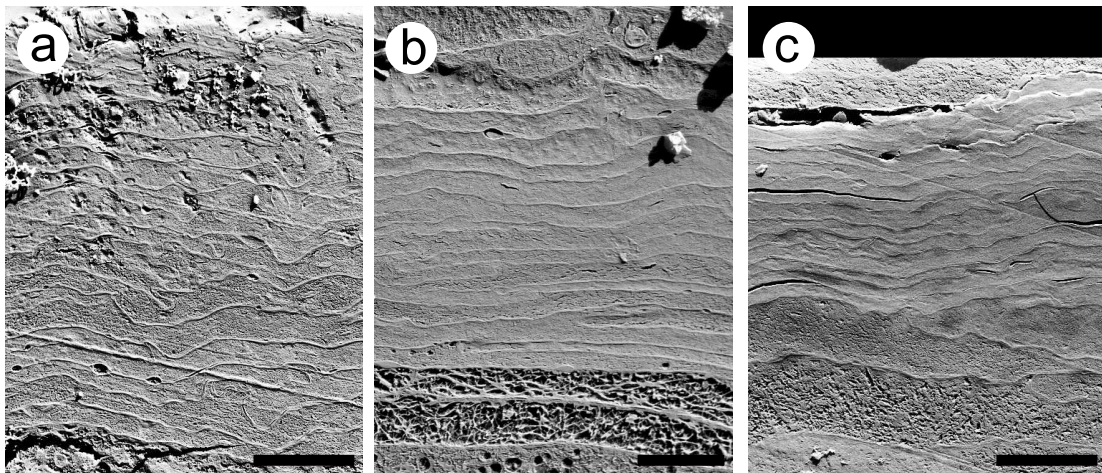


Abbildung 4.19: Gesamtmorphologie des Stratum Corneum nach Quellung (Hauptexperiment) in einer Feuchtekammer (a), 0 % NaCl (destilliertes Wasser) (b) und 15 % NaCl (c). Meßbalken: 4 μm [Oberarmhaut, weiblich, 73 Jahre]

Kurvenscharen aller Dickenmessungen farbcodiert aufgetragen sind. Allerdings werden im folgenden nur die ersten fünfzehn Schichten beschrieben und interpretiert. Höhere Schichten

konnten zwar vereinzelt erhalten und analysiert werden, allerdings waren sie zu selten (Tabelle 4.1 auf Seite 85), um vergleichende Aussagen machen zu können – insbesondere die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser wenigen Werte sind äußerst vorsichtig zu bewerten.

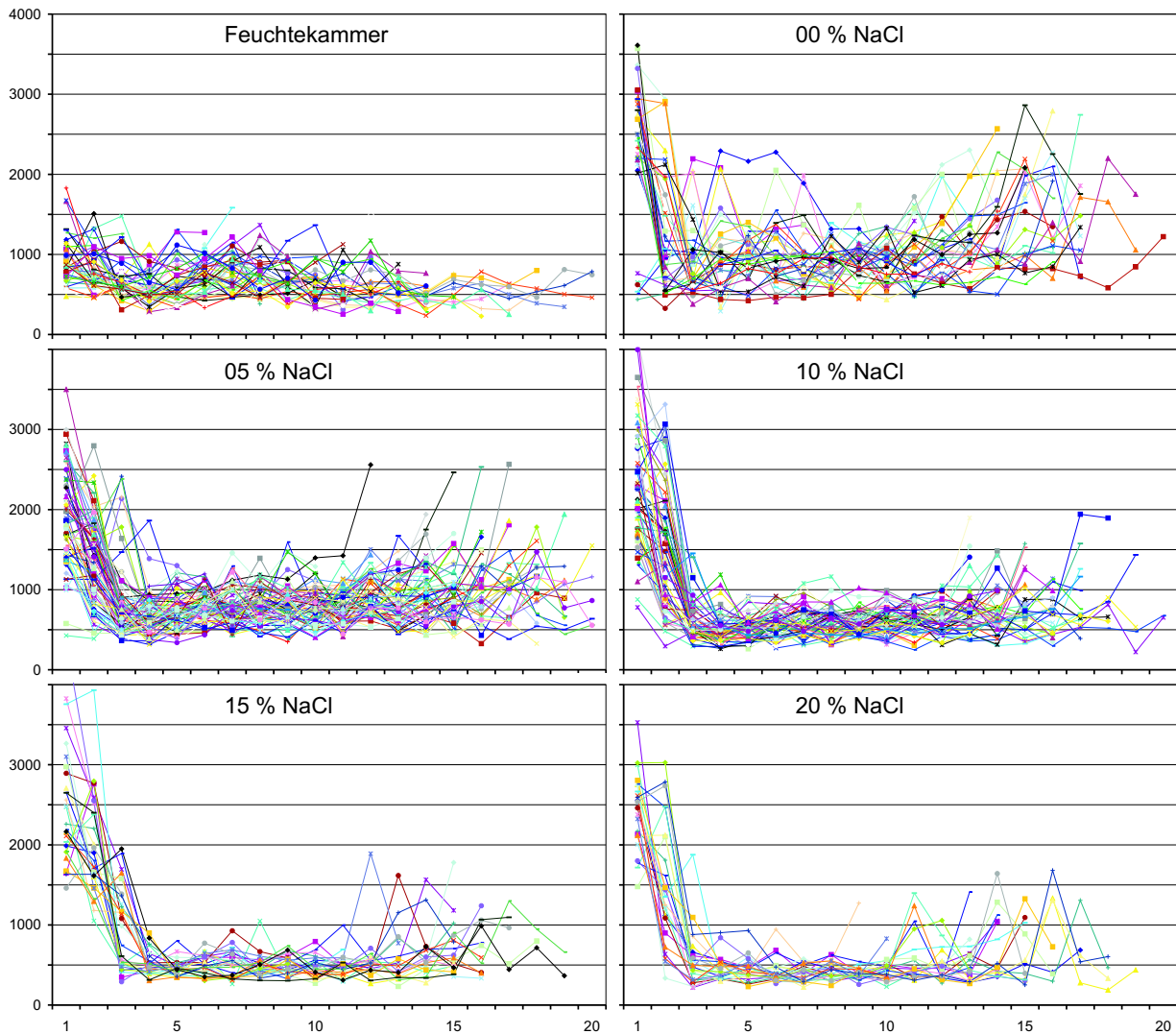


Abbildung 4.20: Dickenmessungen nach Quellung (Hauptexperiment): Die Nummer der Stratum Corneum-Schicht ist entlang der Abzisse aufgetragen, die korrespondierende Dicke in nm entlang der Ordinate.

Referenzproben (Gesättigte Wasserdampfatmosfera)

Morphologisch sieht das Stratum Corneum sehr homogen aus. Die Dicken der einzelnen Corneozyten liegen hauptsächlich zwischen 400 nm und 1000 nm; Dicken oberhalb von

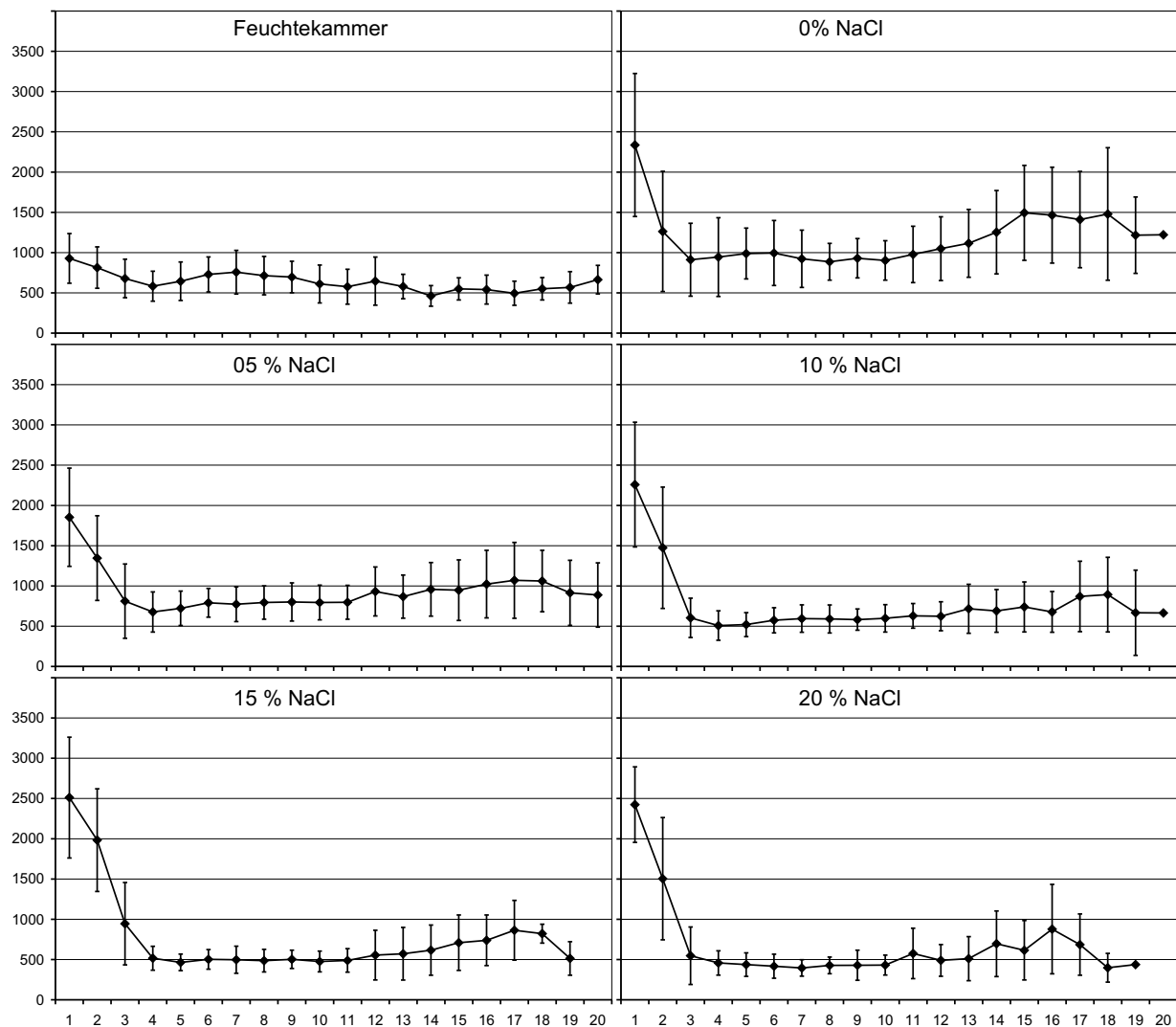


Abbildung 4.21: Mittelwerte der Dickenmessungen nach Quellung (Hauptexperiment): Die Nummer der Stratum Corneum-Schicht ist entlang der Abzisse aufgetragen, die korrespondierende mittlere Dicke in nm entlang der Ordinate. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen.

1500 nm kamen dagegen nur sehr selten vor (vergleiche Abbildung 4.20 auf der vorigen Seite). Die mittlere Dicke verringert sich von der Innenseite des Stratum Corneum zur Außenseite von rund 900 nm auf rund 550 nm, während die Standardabweichung der Messungen deutlich von 250 nm auf unter 150 nm sank.

NaCl-Lösungen

0 % (destilliertes Wasser) Hier kommt es stets zur Ausbildung der bereits beschriebenen Wasserkavitäten in unterschiedlichen Größen. Während die ersten beiden Schich-

	Schicht		
	1	15	19
Feuchtekammer	42	11	4
0 % NaCl	36	23	3
5 % NaCl	70	49	13
10 % NaCl	60	33	4
15 % NaCl	28	19	2
20 % NaCl	25	12	1

Tabelle 4.1: Anzahl der Dickenmessungen für verschiedene Schichten bei den verschiedenen Behandlungen im Hauptexperiment. Alle Aussagen beziehen sich nur auf die Daten bis Schicht 15, da höhere Schichten experimentell schwer zu präparieren bzw. zu analysieren waren.

ten des Stratum Corneum stets gleichbleibend große Segregationsmuster zeigten, waren die folgenden Schichten in Morphologie (insbesondere Segregationsmuster) und Dicke sehr uneinheitlich. Das zeigt sich auch in den Daten von Abbildung 4.20: Die Corneozyten haben typischerweise eine Dicke zwischen 500 nm und 1500 nm, wobei aber auch Dicken bis 3500 nm vorkommen – hauptsächlich beim Übergang zum Stratum Granulosum und oberhalb von Schicht 10. Die mittlere Dicke der Corneozyten ist in den Schichten 3 bis 11 mit weniger als 1000 nm am geringsten. Bei der Standardabweichung gibt es keine eindeutige Tendenz.

5 % und 10 % NaCl Bei den mittleren Salzkonzentrationen ist die Dickenvariation in den untersten Schichten unverändert hoch (zwischen 700 nm und 3500 nm). Darüber ist die Schwankung hingegen geringer: So kommen hauptsächlich Dicken zwischen 500 nm und 1000 nm vor. Die Standardabweichung zwischen Schicht 3 und Schicht 11 ist am kleinsten. Bei 5 % sind regelmäßig Wasserkavitäten zu finden – bei höheren Konzentrationen hingegen nicht mehr.

15 % und 20 % NaCl In den Schichten 1 bis 3 sowie ab Schicht 12 ist die mittlere Dicke in der gleichen Größenordnung wie bei den anderen Salzkonzentrationen. Auch die Dickenvariation zeigt keine deutliche Veränderung. Anders hingegen die Schichten 4 bis 11: Sie haben eine mittlere Dicke von ungefähr 500 nm und zeigen mit weniger als 140 nm die geringste Standardabweichung, die im Hauptexperiment überhaupt aufgetreten ist.

4.3.3 Morphologieveränderungen im Kontrollexperiment

Für das Kontrollexperiment wurde Gesichtshaut gewählt, um den Einfluß der verschiedenen Körperareale analysieren zu können. Zudem wurde sichergestellt, daß Wasser aus den applizierten Lösungen nur durch das Stratum Corneum eindringen konnte – nicht aber durch die Seitenfläche der Hautstanze. Gesichtshaut ist wesentlich dünner als Oberarmhaut. In

Übereinstimmung mit der Literatur [38] wurden meist 8 oder 9 Schichten gefunden (Tabelle 4.2 auf Seite 89) – daher sollen im folgenden auch nur diese morphologisch beschrieben und ausgewertet werden.

Referenzprobe Direkt nach Eintreffen der Haut in der luftdichten Transportdose wurden mehrere Hautstanzen angefertigt, um als Referenz zu dienen. Zwar haben sie die geringstmögliche externe Beeinflussung erfahren, waren aber der Wasseratmosphäre ausgesetzt, die sich in der Plastikdose ausgebildet hat. Die einzelnen Dickenmessungen zeigten nur wenig Varianz. Sowohl die mittlere Dicke als auch deren Standardabweichung nehmen zur Hautaußenseite hin kontinuierlich ab (von 900 nm bzw. 250 nm auf 400 nm bzw. 100 nm) (vergleiche auch Abbildung 4.23 auf Seite 88).

Feuchtekammer und destilliertes Wasser (0 %) Bei allen diesen Behandlungen fällt auf, daß die ersten 2-3 Schichten wesentlich dünner sind als im Hauptexperiment: Während dort Dicken oberhalb 2500 nm häufig vorkamen, fehlen sie im Kontrollexperiment fast vollständig. Weiterhin sind diese Schichten sogar dünner als die direkt darauffolgenden. Ansonsten zeigen die mittleren Dicken der Proben der Feuchtekammer keine eindeutige Tendenz, während nach Behandlung mit destilliertem Wasser das mittlere Stratum Corneum um circa 500 nm dicker ist als in den anderen Bereichen. Die Standardabweichung zeigt bei beiden Behandlungen keine klare Tendenz.

20 % NaCl Wenn die Gesichtshaut mit 20%iger Kochsalzlösung behandelt wurde, weisen die ersten beiden Schichten des Stratum Corneums die höchsten Dicken auf. Die Schichten 4 bis 6 hingegen heben sich dadurch hervor, daß sie mit circa 500 nm die geringste Dicke und mit circa 140 nm eine ebenso geringe Standardabweichung haben wie die ambienten Referenzproben. Zur Hautaußenseite hin nimmt dann sowohl die mittlere Dicke als auch die Standardabweichung wieder zu.

Vaseline Ein Verhindern des Wasseraustausches des Stratum Corneums mit der Atmosphäre durch Vaseline führt zu einem homogenen Aufquellen aller Schichten in Bezug auf die Referenzprobe; nur bei den äußersten Schichten sinkt die mittlere Dicke ab. Die Standardabweichung ist nahezu konstant.

4.3.4 Zeitaufgelöste Morphologieuntersuchungen mit Glycerin

Zusätzlich zu den Quellexperimenten mit Kochsalzlösungen wurden auch Versuche mit reinem Glycerin gemacht. Es wurde ebenso wie in den Kontrollexperimenten appliziert, sodaß es nur Kontakt zum Stratum Corneum der Haut hatte. Allerdings wurden die Proben bereits nach 2 beziehungsweise 6 Stunden gefroren, sodaß auf diese Weise die morphologischen Veränderungen auch zeitabhängig studiert werden konnten. Als Referenz dienten Proben, die direkt nach Ankunft der Haut aus der geschlossenen Transportdose entnommen und gefroren wurden. In ihr herrschte – wie bereits beschrieben – eine Wasserdampf-atmosphäre.

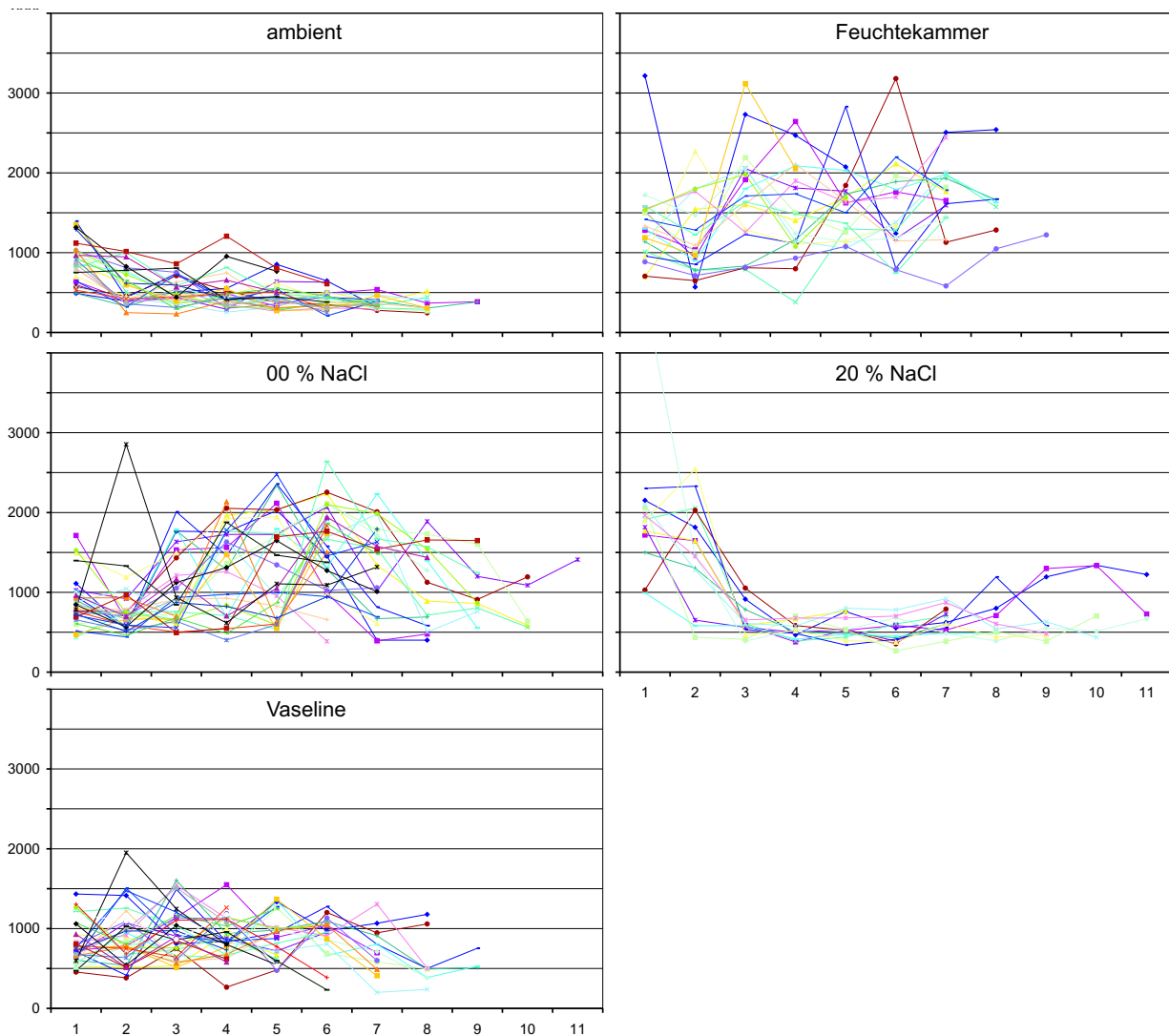


Abbildung 4.22: Dickenmessungen nach Quellung (Kontrollexperiment): Die Nummer der Stratum Corneum-Schicht ist entlang der Abzisse aufgetragen, die korrespondierende Dicke in nm entlang der Ordinate.

Dickenveränderungen Tendenziell nimmt die Dicke der einzelnen Corneozyten bei diesen Experimenten zur Hautaußenseite hin ab. Dies ist besonders ausgeprägt bei den Proben, die direkt aus der geschlossenen Transportdose mit der darin enthaltenen Wasserdampf-atmosphäre entnommen und gefroren wurden (Referenzproben). Über alle Schichten des Stratum Corneums hinweg ist festzustellen, daß die Dicke in diesen Referenzproben am höchsten und bei 2 Stunden Glycerinexposition am niedrigsten ist. Die Proben der 6 Stunden Behandlung liegen dazwischen. Allerdings ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant, da er in den Größenordnungen der Standardabweichungen (ca. 140 nm) liegt.

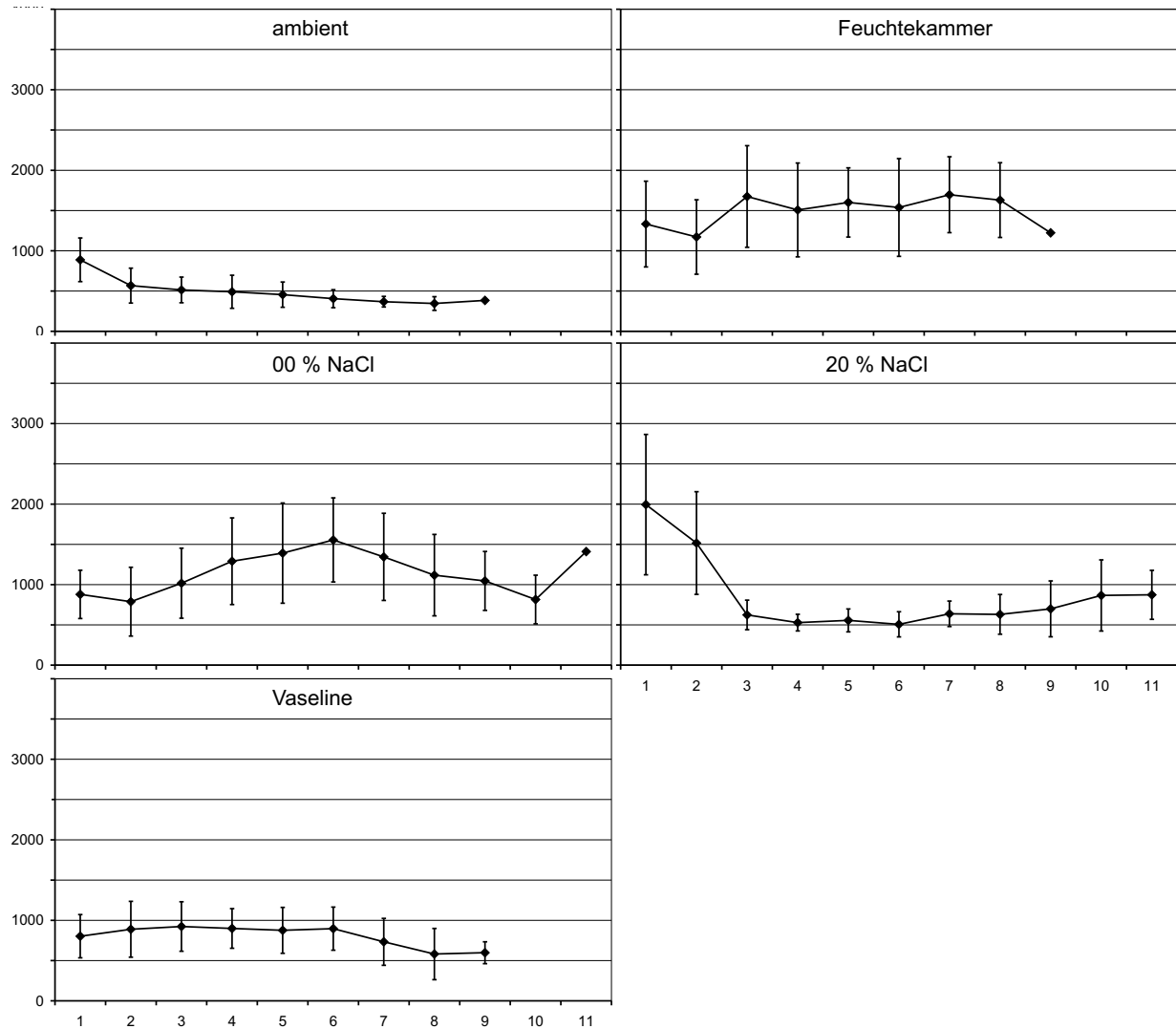


Abbildung 4.23: Mittelwerte der Dickenmessungen nach Quellung (Kontrollexperiment): Die Nummer der Stratum Corneum-Schicht ist entlang der Abzisse aufgetragen, die korrespondierende mittlere Dicke in nm entlang der Ordinate. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen.

Die Anzahl der Einzelmessungen sind in Tabelle 4.3 auf der folgenden Seite angegeben.

	Schicht		
	1	4	8
ambient	30	30	10
Feuchtekammer	20	20	7
0 % NaCl	32	31	16
20 % NaCl	14	14	9
Vaseline	34	34	9

Tabelle 4.2: Anzahl der Dickenmessungen für verschiedene Schichten bei den verschiedenen Behandlungen im Kontrollexperiment. Alle Aussagen beziehen sich nur auf die Daten bis Schicht 8, da die höheren Schichten experimentell schwer zu präparieren bzw. zu analysieren waren.

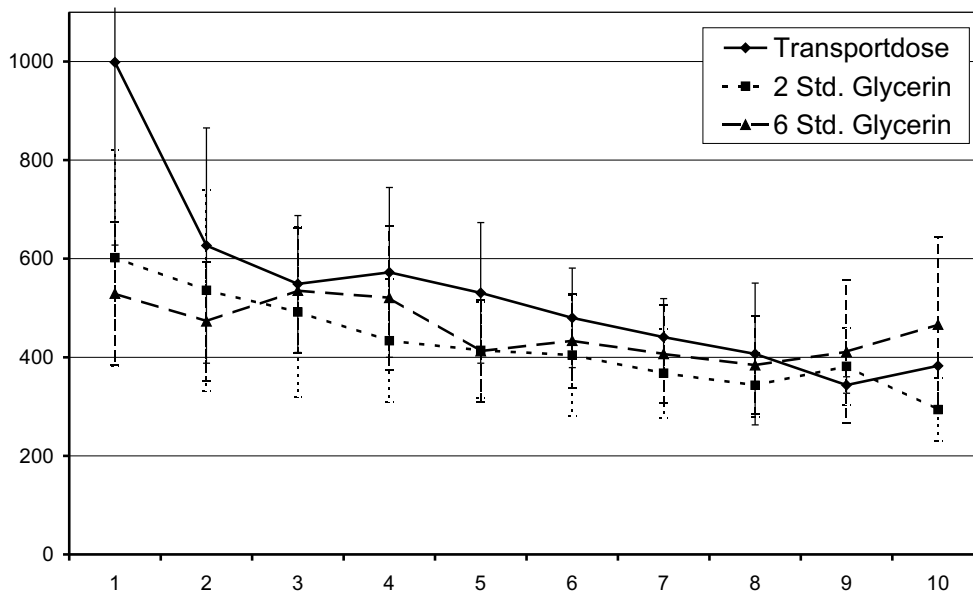


Abbildung 4.24: Dickenveränderungen im Stratum Corneum nach Glycerinexposition: Die Nummer der Stratum Corneum-Schicht ist entlang der Abzisse aufgetragen, die korrespondierende mittlere Dicke in nm entlang der Ordinate. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen.

	Schicht		
	1	7	8
Transportdose	18	15	3
2 Stunden	36	31	22
6 Stunden	13	12	10

Tabelle 4.3: Anzahl der Dickenmessungen für verschiedene Schichten bei verschiedenen Behandlungsdauern im Glycerinexperiment.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Diskussion der experimentellen Methoden

Obwohl die OP-Haut der Privatklinik vor der Extraktion mit einem Desinfektionsmittel abgewischt wurde, bewirkte dies offenbar keine Beschädigung des Stratum Corneums, das größtenteils vollständig erhalten werden konnte. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist dies einerseits erkennbar an teilweise noch auf der Oberfläche befindlichen Resten des applizierten Mediums, das zusammen mit der Haut gefroren und präpariert wurde, sowie andererseits an der Gesamtzahl der Corneozyten-Schichten (13-18 bei der Oberarmhaut beziehungsweise 8-11 bei der Gesichtshaut), die in Übereinstimmung mit Literaturwerten für diese Hautareale (15 ± 4 beziehungsweise 9 ± 2) liegt [38].

Durch die unterschiedlichen Gefriertechniken ergaben sich erwartungsgemäß unterschiedliche Gefrierartefakte: Während die hochdruckgefrorene Haut in allen Schichten nur kleine oder sogar überhaupt keine detektierbaren Segregationsmuster aufwies, eignete sie sich allerdings ausschließlich für exemplarische Strukturanalysen im Nanometerbereich, weil ihre Präparation zu zeitaufwendig und die Probengröße deutlich* beschränkt war. Die plungetrorenen Proben zeigten dagegen zwar größere Segregationsmuster, allerdings konnten durch diese Gefriertechnik problemlos 3 mm Hautstanzen arretiert werden und es ließ sich ein Probendurchsatz erreichen, der schließlich eine statistische Analyse ermöglichte.

Auch innerhalb der Haut zeigten sich lokal unterschiedliche Segregationsmuster in Form von Hohlräumen: Grundsätzlich sind für ihre Größe die Gefriereschwindigkeit wie auch der Wassergehalt verantwortlich. In der Dermis zeigen sich aufgrund des hohen Wassergehaltes (über 85 %) sowie ihres Abstandes zur Kontaktfläche mit dem Kältemittel (größer als 100 μm) beim Plungetiefrieren einheitlich große Gefrierartefakte. In den lebenden Schichten der Epidermis nahm ihre Anzahl und Größe mit abnehmendem Abstand zur Hautoberfläche ab. Im Stratum Corneum hingegen trat diese Abhängigkeit nicht mehr auf: Zwar zeigten die tiefsten Corneozytenschichten ausgeprägte Segregationsmuster, die in den nächsthöheren Schichten zunächst deutlich kleiner wurden. Die äußeren Bereiche des Stratum Corneum hatten aber den direktesten Kontakt mit dem Kältemittel, sodaß die Gefriereschwindigkeit

* maximaler Durchmesser der Hautstanzen: 2 mm, maximale Dicke: 0,2 mm.

hier maximal war; trotzdem zeigten die Corneozyten hier erneut ausgeprägte Segregationsmuster. Sie schienen daher im Stratum Corneum primär durch den Gehalt der Zellen an frei verfügbarem Wasser determiniert zu sein.

5.1.1 Cryo-Ultramikrotomie und Cryo-Präparation

Durch die Verwendung des Ultramikrotoms im Cryobetrieb konnten sowohl von den gefrorenen 3 mm-Hautstanzen als auch von den wesentlich dünneren hochdruckgefrorenen Proben (bei Verwendung einer speziellen Spannzange) reproduzierbar plane Querschnittsflächen angefertigt werden. Kollagen wurde als Beispiel für ein Biomolekül untersucht, das auf verschiedenen Größenordnungen strukturiert ist: Die Kollagen-I-Fibrillen haben einen Durchmesser von 50 nm–200 nm und eine Periodizität in Faserrichtung von 67 nm (siehe Abschnitt 2.1.2 ab Seite 6), die Kollagenmoleküle (Tripel-Helices) einen Durchmesser von 1,5 nm.

Für die Anfertigung der Querschnitte spielten unterschiedliche Härten auf mikroskopischer Ebene keine Rolle: So wurden intrazelluläre Vesikel und Zellmembranen ebenso sauber durchtrennt wie beispielsweise Kollagenfasern. Es zeigten sich keine Stauchungen oder Risse im Gewebe in Schnittrichtung (vergleiche beispielsweise Abbildung 4.8 auf Seite 70). Die beobachteten Material schrumpfungen sind höchstwahrscheinlich auf Wassersublimationen durch die Gefrierätzung oder den Elektronenstrahl zurückzuführen. Auf makroskopischer Ebene kam es bei unterschiedlich harten Geweben nur in kleinen, lokal eng begrenzten Gebieten zu Schnittartefakten: So brachen beim Querschnitt von Haaren Zellfragmente in einer Größenordnung von weniger als 10 µm heraus (vergleiche Abbildung 4.10b auf Seite 73), wohingegen sich um die härteste Struktur – das Haar selbst – keine Schnittartefakte bilden (so scheinen die Risse in dem eingesetzten Bild von Abbildung 4.10a nicht mit der Schnittrichtung (erkennbar an den Messerriefen) zu korrelieren). Auch bei weiche- ren Strukturen kommt es nur zu Rissen von wenigen Mikrometern, was sich beispielsweise als Separation zwischen einem Fetttropfen und der ihn umgebenden Dermis zeigt (Abbildung 4.11c auf Seite 74).

Die Verwendung eines Trimmdiamanten war für die Beurteilung der Morphologie des Stratum Corneum völlig ausreichend. Um allerdings Strukturen unterhalb von circa 20 nm darzustellen und gleichzeitig einen Großteil der Schnittartefakte zu vermeiden, ist die Verwendung eines qualitativ hochwertigeren Schneidediamanten notwendig, mit dem entsprechend langsamer und vorsichtiger gearbeitet werden mußte. Dies verlängerte den Zeitaufwand um circa eine Stunde. Durch die Verwendung eines Ionisators beim Schneiden kann die frisch präparierte Oberfläche reproduzierbar vor Hautbruchstücken geschützt werden.

Insgesamt erlaubte die Cryo-Ultramikrotomie, extrem plane Oberflächen von allen verwendeten Oberflächen innerhalb kurzer Zeit (typischerweise 4 Stunden) anzufertigen. Damit war es möglich geworden, eine Probe mittels Hochdruckgefrierens zu fixieren, einen Querschnitt anzufertigen, mit Schwermetall zu bedampfen und noch am gleichen Tag an dieser Probe Ultrastrukturuntersuchungen im Rasterelektronenmikroskop durchzuführen. Insbesondere konnten an den hochdruckgefrorenen Proben auch Mikrostrukturen wie Desmosomen, Intermediärfilamente und einzelne Kollagenfasern strukturell untersucht werden.

Das große Volumen der Hautproben für die Rasterelektronenmikroskopie machte eine eingehende Untersuchung auch auf ultrastruktureller Ebene ohne ausgeprägte Strahlenschäden möglich. Ursächlich dafür war die dicke Kohlenstoffschicht, die neben ihrer stabilisierenden Wirkung auch eine eventuelle Aufladung der Probenoberfläche verminderte; für die detektierten Rückstreuielektronen war diese Schicht nahezu transparent. Mit einer vergleichsweise einfachen und schnellen Cryo-Präparation konnte im realen Einsatz ein hoher Probandendurchsatz erreicht werden, der eine umfangreiche Datenakquisition samt statistischer Auswertung überhaupt erst möglich machte. Mit einem unveränderten Präparationsablauf hätten auch Hautstanzen mit einem Durchmesser von 6 mm angefertigt und mikroskopiert werden können.

5.1.2 Gefriersubstitution

Nachteilig bei der Gefriersubstitution war die lange Präparationzeit von einer Woche. Eine zeitnahe Untersuchung von Hautproben kurz nach ihrer Entnahme/Fixierung wie durch die Cryo-Präparation war damit unmöglich. Es wurden während der Dissertation auch Versuche gemacht, die Gefriersubstitution zeitlich zu straffen oder die Anzahl der verwendeten Substanzen zu verringern. Alle Versuche mündeten aber in zusätzlichen Artefakten, sodaß weiterhin nur der zeitliche Ablauf benutzt wurde, wie er in Tabelle 3.2 auf Seite 57 beschrieben ist. Auffällig ist ferner, daß das Stratum Corneum stets am schlechtesten erhalten war: So zeigte es sich nach Substitution, Einbettung, Ultradünnschnitt und Nachkontrastierung im Transmissionselektronenmikroskop meist sehr elektronendicht, die einzelnen Schichten waren mehr oder weniger voneinander separiert und hatten nur noch wenige Kontaktstellen. Die Corneozyten selbst erschienen größtenteils – bis auf die Überreste von kollabierten Intermediärfilamenten – leer. Es ist bekannt, daß Kunststoffmonomere Zellbestandteile auswaschen können: Beispielsweise berichtet Hess in [78] von der Extraktion lipidreicher Bereiche durch LR-white, SPURRS Medium und Epon. Es ist daher anzunehmen, daß prinzipiell auch HM20 dieses Potential hat. Eventuell wird dies verstärkt durch Zerstörungen innerhalb der Zellen durch Eiskristallwachstum und/oder osmotische Volumenveränderung durch die verschiedenen eingesetzten Lösungen. Der Erhaltungszustand des Stratum Corneums ist wahrscheinlich durch dessen Funktion als Diffusions- und Permeabilitätsbarriere eingeschränkt, die auch die vollständige Entwässerung samt Infiltration des Kunststoffmonomers erschweren wird. Dem entgegen steht allerdings die vielfach fehlende Mikrostruktur des Intrazellularraumes, was wiederum auf eine Auswaschung von Zellbestandteilen hindeutet. Die wahrscheinlichste Ursache liegt in der frühen Phase der Gefriersubstitution, bei der das Uranylacetat das biologische Gewebe fixieren und damit stabilisieren soll. Wird dies nicht zuverlässig gewährleistet, so können die nachfolgenden Aceton- und Ethanol-Spülschritte für die beobachtete Separation der Stratum Corneum-Schichten und die Extraktionsphänomene verantwortlich sein. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, daß bei nachfolgenden Versuchen im Anschluß an diese Arbeit eine Zugabe von Osmiumtetroxid die beschriebenen Artefakte weitgehend verhindert. Auch in der Literatur wird berichtet, daß Substitution ohne Osmium insgesamt die Ultrastrukturpräservierung beeinträchtigen kann [78] – allerdings ist auch mit Uranylacetat alleine ein Erhalt der Ultrastruktur möglich

[69]. Wie bereits im Methodenteil erwähnt, ist allerdings ein Einsatz von Osmiumtetroxid durch die einhergehende Schwarzfärbung der Probe problematisch, wenn sie in ein Polymer eingebettet wird, das durch UV-Licht polymerisiert wird – wie dies bei HM20 der Fall ist. Durch den schlechten Strukturerhalt und die Extraktion von Zellbestandteilen ist es auch nicht weiter verwunderlich, wenn Lipide des Interzellularraumes weder im Stratum Corneum noch im Stratum Granulosum durch die Substitution erhalten werden konnten. Stratum Granulosum-Lipide waren nur in Vesikeln nachweisbar. Offenbar schützen sie ihren Inhalt vor Extraktion. Bestätigt wird diese Vermutung dadurch, daß in solchen Vesikeln, die im Zuge der Exocytose mit der Zellmembran verschmolzen waren, die Lipidstapel bereits teilweise aufgelöst waren. Umgekehrt zeigt dies, daß grundsätzlich auch mit der benutzten Gefriersubstitution Lipide und ihre Organisationsform erhalten bleiben können und daß wahrscheinlich nur die Initialfixation durch Uranylacetat nicht ausreichend war.

Von diesen Schwierigkeiten abgesehen, wurden die gefriersubstituierten und eventuell nachkontrastierten Dünnschnitte als Referenz für hochauflösende Mikroskopie von Ultrastrukturen genutzt (so geschehen am Kollagen, an Desmosomen und Intermediärfilamenten), um sie mit den Aufnahmen der hochdruckgefrorenen und cryopräparierten Proben zu vergleichen.

5.1.3 Ultrastrukturdarstellung im REM und TEM

Die untersuchten Cryo-Anschnittsflächen der Hautproben stellten sich im Rasterelektronenmikroskop ausnahmslos als kompakte, zusammenhängende Biostruktur dar; weder auf makroskopischer noch auf mikroskopischer Ebene zeigten sich leere Bereiche. Dies belegt eindeutig, daß das Stratum Corneum bei der Biopsieentnahme in seiner strukturellen Integrität erhalten bleibt, seine aufgelöste Struktur in den Aufnahmen des Transmissionselektronenmikroskops also eindeutig ein Präparationsartefakt ist. Das bedeutet auch, daß scheinbar "leere Bereiche" in den TEM-Bildern (beispielsweise die hellen Bereiche in Abbildung 4.9 auf Seite 71) nur solche Bereiche sind, die nicht durch ein Schwermetall kontrastiert wurden, denn das Rasterelektronenmikroskop zeigt auch die Dermis als vollständig zusammenhängenden Bereich (Abbildung 4.13a auf Seite 76).

Kollagen

Überraschend ist, daß die periodische 67 nm Unterstruktur des Kollagens auf den präparierten Querschnittsflächen der hochdruckgefrorenen Proben im Rasterelektronenmikroskop nur in Ausnahmefällen und dann nur entlang von kurzen Abschnitten dargestellt werden konnte (siehe Abbildung 4.13b auf Seite 76). Nur bei Mikrobrüchen tritt die Periodizität deutlich hervor (Abbildung 4.13c).

Hingegen waren durch diese Präparation auch einzelne Kollagenfibrillen längs angeschnitten, was die helikale Unterstruktur, gebildet aus den Subfibrillen, offenlegte (kleines Bild in Abbildung 4.13b). Da erste grobe Ausmessungen dieser Bilder den Durchmesser dieser Fibrillen im Bereich zwischen 10 nm bis 30 nm eingrenzten, kann es sich dabei nicht um die dreisträngigen Kollagenmoleküle handeln, da sie nur einen Durchmesser von circa 1,5 nm

haben. An Einzelbildern wurde der Winkel, den die Subfibrillen mit der Kollagenfibrille einschließen, zu $(19 \pm 3)^\circ$ abgeschätzt. Dies legt nahe, daß es sich hier um Typ-C Fibrillen handelt, die laut Literatur [13] einen Winkel von 17° aufweisen (im Gegensatz zu den Typ-T Fibrillen mit ungefähr 5°). In der Tat ist in menschlicher Haut ein Auftreten von Typ-C Fibrillen wahrscheinlich, da sie hauptsächlich in anatomischen Bereichen zu finden sind, wo das Bindegewebe starke und wiederkehrende Deformationen widerstehen muß. Hingegen tauchte in den transmissionselektronenmikroskopischen Bildern diese helikale Substruktur der Fibrillen nicht auf. Dort allerdings ist die 67 nm-Periodizität in der Querstreifung leicht darstellbar und bei höherer Vergrößerung auch eine Unterstruktur dieser Querstreifung (vergleiche Abbildung 2.3 auf Seite 7). Wie bereits vorher diskutiert muß dabei allerdings beachtet werden, daß nur solche Strukturdetails im Transmissionselektronenmikroskop sichtbar sind, die sich auch durch ein Schwermetall kontrastieren lassen.

Intermediärfilamente

Es wurden die Intermediärfilamente im Stratum Corneum analysiert und interpretiert, da sie unter anderem auch für die mechanische Stabilität der Corneozyten verantwortlich sind. Durch eine Gefriersubstitution wurden sie meist schlecht erhalten, da sie teilweise extrahiert und teilweise durch Segregation geschädigt wurden. In den Cryo-Anschnittsflächen konnten sie nur selten dargestellt werden. Die wahrscheinlichste Ursache dafür ist, daß insgesamt zu wenig gefriergeätzt wurde, um die Filamente aus dem Restzytoplasma freizulegen. Andererseits ist nicht klar, welchen Einfluß ein stärkerer Wasserverlust auf die Ultrastruktur allgemein haben würde. Konnten die Intermediärfilamente dargestellt werden, so war in jedem Corneozyt eine Hauptorientierung festzustellen; ob es für das gesamte Stratum Corneum eine (eventuell schichtabhängige) Vorzugsrichtung gibt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden.

Desmosomen und Zellverklammerungen

Es wurden nur Desmosomen des Stratum Corneums untersucht. Selbst bei Gefriersubstitutionen mit insgesamt schlechtem Strukturerehalt waren sie noch gut präserviert. Insbesondere war die Lipiddoppelmembran dort meist gut erhalten, während sie außerhalb der Desmosomen größtenteils fehlte. Auch wenn das Stratum Corneum durch die Gefriersubstitution größtenteils separiert war, stellten die Desmosomen noch die letzten Kontakte zwischen den Corneozyten her. Dies macht ihre mechanische Stabilität und damit ihre Bedeutung für die strukturelle Gesamtintegrität klar. Zellverklammerungen fehlten hingegen im überwiegenden Teil der gefriersubstituierten Proben. Erhalten werden konnten sie nur, wenn sie mit mehreren Desmosomen vergesellschaftet waren und das Stratum Corneum in diesem Bereich noch zusammenhing. Bei den Untersuchungen der hochdruckgefrorenen Proben im Rasterelektronenmikroskop wurden hingegen Zellverklammerungen gleichmäßig über alle Schichten verteilt gefunden. Dies legt nahe, daß ein großflächiges Fehlen dieser Strukturelemente ein Artefakt der Gefriersubstitution ist und die Cryo-Präparation eine zuverlässigere Erhaltung gewährleistet. Desmosomen hingegen konnten ebenso wie die

Intermediärfilamente nur dann samt ihrer Feinstruktur sichtbar gemacht werden, wenn ausreichend Wasser aus der Oberfläche durch Gefrierätzung entfernt wurde (Abbildung 4.8c auf Seite 70); andernfalls waren sie nur identifizierbar als Verschmelzungspunkte der Membranen zweier Corneozyten ohne sichtbare Unterstruktur.

5.2 Quellverhalten und Stabilität im Stratum Corneum

Zwar zeigten die plungefrorenen Proben Segregationsartefakte durch das Gefrieren; es ist allerdings aufgrund der Fehlerabschätzung der Eiskristallgröße gegenüber der Corneozytendicke anzunehmen, daß dies keine Auswirkungen auf die Dickenmessungen hatte: So ist nämlich für reines Wasser mit einer Volumenvergrößerung von ungefähr 8%* durch ein Auskristallisieren zu rechnen – für das Stratum Corneum hingegen mit einem noch geringeren Wert, da hier der Wassergehalt nur 10 % bis 40 % beträgt ([21], [87], [24], [22]). In den durchgeführten Messungen wäre aber diese Verfälschung irrelevant, da bei den Dickenmessungen bereits die Standardabweichung zwischen 25 % und 40 % des Mittelwertes ausmacht. Sie wird für jede Schicht aus den Einzelmessungen berechnet und diskutiert. Dabei ist allerdings zu beachten, daß dies nicht als Meßfehler zu verstehen ist, sondern vielmehr als Maß für die Variation der Dicken. Das kommt insbesondere daher, daß innerhalb eines Corneozyten die Fragmente des Zellkerns im unteren und mittleren Stratum Corneum noch nicht vollständig abgebaut sind und zu einer lokalen Verdickung – meist nahe der Mitte – führen.† Je nachdem, in welcher Ebene der Corneozyt angeschnitten wird, ergibt sich somit eine mehr oder weniger große Dickenvariation. Der wirkliche Meßfehler hingegen lag bei maximal 15 nm (entsprechend circa 1,5 % bei typischen Dicken von 1000 µm).

5.2.1 Morphologieveränderungen

Die augenfälligste Morphologieveränderung war die Ausbildung der großen Wasserkavitäten, die nur bei Applikation von destilliertem Wasser oder einer 5%igen Kochsalzlösung auftreten. Im Hauptexperiment, in dem das applizierte destillierte Wasser auch durch die Seitenwand der Hautstanze eindringen konnte, kamen sie gehäuft über einen Bereich von einigen 100 µm vor (vergleiche Abbildung 4.16 auf Seite 80). Im Kontrollexperiment hingegen, wo ein Wasserinflux nur durch das Stratum Corneum möglich war, traten sie hauptsächlich isoliert auf, waren aber im einzelnen von vergleichbarer Größe. Bei Applikation einer 5%igen Kochsalzlösung waren die Kavitäten insgesamt kleiner und stets isoliert voneinander. In diesem Zusammenhang wurde auch Unterarmhaut eines 41-jährigen männlichen Probanden unter ambienten Bedingungen entnommen und nach spätestens 3 Minuten hochdruckgefroren, um den natürlichen Hydratationszustand mit bestmöglichem Strukturerehalt zu präservieren. Auch hier zeigten sich regelmässig kleine und kleinste Wassereinschlüsse zwischen

* Wasser hat bei Raumtemperatur und -druck ungefähr eine Dichte von 1000 kg/m^3 , bei kristallinem (hexagonalem) Eis wird sie zu 917 kg/m^3 [86] angegeben.

† Vergleichbar mit der lokalen Verdickung durch das Eigelb in einem Spiegelei.

den Schichten des Stratum Corneums (typische Abmessungen unter 1 μm). Zusammengekommen läßt sich dies so interpretieren, daß der Salzgehalt (Osmolarität) der applizierten Lösungen ursächlich für Ausbildung und Größe der Flüssigkeitseinschlüsse ist, für deren Häufigkeit allerdings die Gesamtmenge des penetrierten Wassers.

Grundsätzlich waren die Wasserkavitäten von unterschiedlicher Größe und hatten eine meist linsenförmige Gestalt. Schon bei der Analyse des durch die Gefriersubstitution stark aufgelockerten Stratum Corneums wurde die große Bedeutung der Desmosomen für den mechanischen Zusammenhalt deutlich. Bei den Hydratationsexperimenten zeigte sich zudem die Bedeutung der Zellverklammerungen der Corneozyten untereinander, die teilweise wie Anker den letzten Kontakt beibehalten haben (siehe insbesondere 4.17b auf Seite 81). Offenbar sind beide Strukturen unverzichtbar für Kohäsion und Integrität und damit auch die Funktionalität des Stratum Corneums. Die Wasserkavitäten wurden auch von Warner *et al.* [6] sowie Bouwstra *et al.* [7] gefunden und beschrieben. Auf die weiteren Ergebnisse dieser Arbeiten wird später eingegangen.

5.2.2 Unterschiedliche Zonen im Stratum Corneum

Ergebnisse des Hauptexperiments

Die ersten drei Stratum Corneum-Schichten der Oberarmhaut im Hauptexperiment zeigten eine außergewöhnliche Morphologie: Außer in der gesättigten Wasserdampf-atmosphäre waren die hydratisierten Corneozyten hier bis über 3 μm dick (vergleiche Abbildung 4.20 auf Seite 83), zeigten eine große Dickenvariation (rund 800 nm) (Abbildung 4.21 auf Seite 84) sowie die größten Segregationsmuster, die im Stratum Corneum überhaupt zu finden waren.

Die mittlere Corneozytendicke wie auch deren Standardabweichung nahmen dann allerdings zur Hautoberfläche hin stark ab und zeigten schließlich in den Schichten 5 bis 10 bei Applikation von 15 %iger und 20 %iger Kochsalzlösung auffallend geringe Werte: Die mittlere Dicke sank auf 500 nm oder darunter und hatte eine Variation (Standardabweichung) von weniger als 200 nm. Dies ist nicht erklärbar durch eine geringere Anzahl von Einzelmessungen (wie dies beispielsweise bei Schicht 18 und 19 der Fall wäre), sondern offenbar ist die biologische Dickenvariation in diesem Bereich wesentlich geringer als im Rest des Stratum Corneums. Qualitativ dieselbe Tendenz findet sich nach Auswertung der Dickenmessung bei den mittleren Salzkonzentrationen (5 % und 10 %). Außer bei Applikation von destilliertem Wasser oder 5 %-Lösung sind in den Schichten 4 bis 10 auch nur sehr kleine Segregationsmuster zu finden, was in Übereinstimmung mit den Dickenmessungen auf einen geringen Wassergehalt und eine geringe Wasseraufnahme hindeutet.

Dieses unterschiedliche Verhalten bei Hydratation rechtfertigt eine Unterteilung des Stratum Corneums in drei Zonen: Für die Oberarmhaut im Hauptexperiment umfaßt die erste Zone die ersten drei Schichten; die zweite Zone reicht von Schicht 5 bis 10 und die letzte (äußerste) Zone von Schicht 12 bis zur Hautoberfläche. Weil die Zählung der Schichten, wie in Abschnitt 3.2.5 ab Seite 52 diskutiert, nicht überall eindeutig ist, ist die Zuordnung der Schichten 3 und 11 zu einer dieser Zonen nicht uneindeutig möglich. Da auch

ihr morphologisches Erscheinungsbild weitgehend uncharakteristisch ist, bilden sie offenbar die Übergangsbereiche und werden aus den folgenden statistischen Betrachtungen ausgeschlossen.

Nimmt man nun die Dickenmessungen aller Schichten in einer bestimmten Zone zusammen und trägt sie für die verschiedenen Hydratationen gegeneinander auf, so erhält man Abbildung 5.1. Bei Hydratation durch eine gesättigte Wasserdampf-atmosphäre zeigten sich die

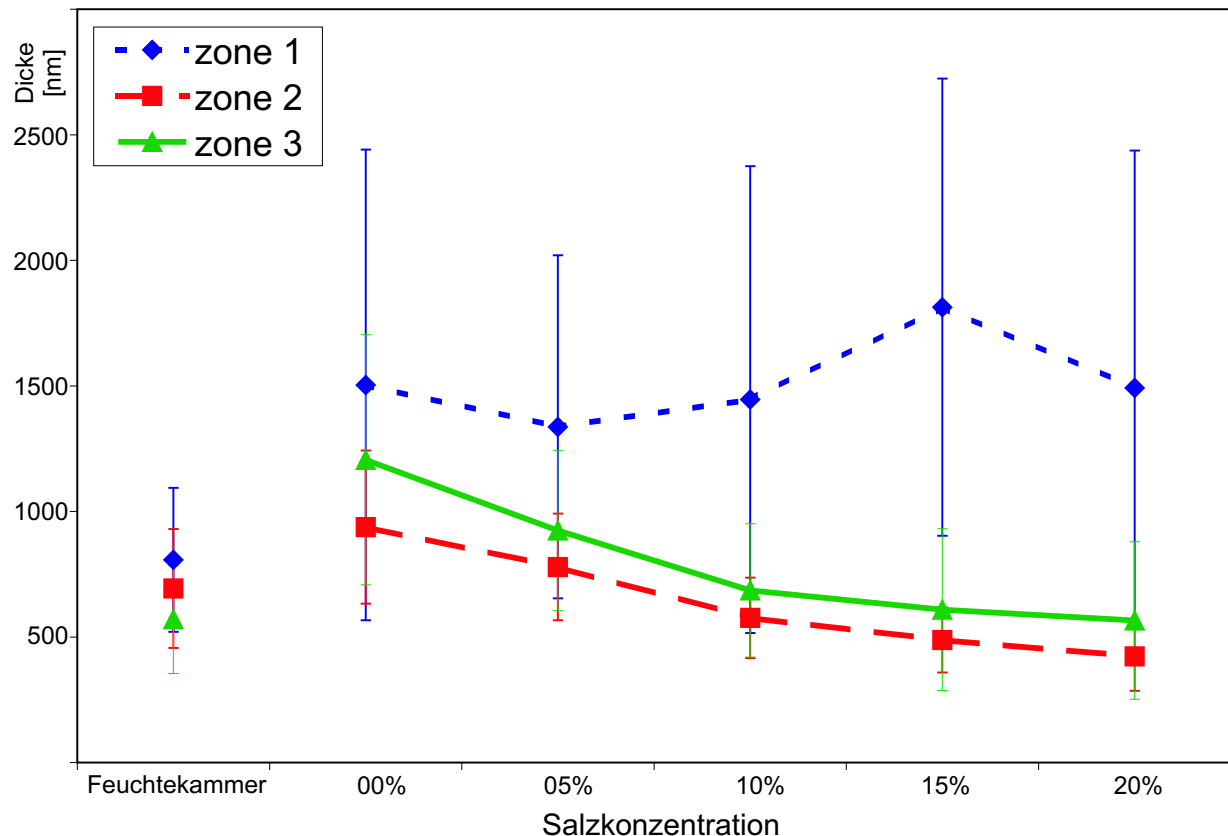


Abbildung 5.1: Dickenvariation der drei Stratum Corneum-Zonen bei Hydratisierung: Zellen der ersten Zone (Schicht 1-3) verdoppeln ihre Dicke relativ zur Referenz (Feuchtekammer) – unabhängig von der applizierten Salzlösung. Zellen der zweiten (Schicht 5-10) und der dritten Zone (Schicht 12-15) zeigen einen deutlichen Abfall der Dicke bei steigender Salzkonzentration. [Wasserinflux durch die Seitenfläche der Hautstanze (Oberarmhaut, weiblich, 73 Jahre) möglich]

drei Zonen in ihrer mittleren Dicke sowie der Standardabweichung im wesentlichen gleich. Die Applikation verschiedener Salzlösungen bewirkte in der ersten Zone eine unspezifische Dickenverdopplung, ohne daß eine klare Abhängigkeit von der Salzkonzentration erkennbar war. Im Gegensatz dazu kam es in der zweiten und dritten Zone insgesamt zu einer geringeren Zunahme der Dicke nach Applikation von destilliertem Wasser und sie sank dann kontinuierlich mit steigender Salzkonzentration ab, bis sie zwischen 15 % und 20 % den kleinsten Wert erreichte.

Da die Variation der mittleren Dicke in einer Stratum Corneum-Schicht durch die Aufnahme von Wasser verursacht wird, sind offenbar Corneozyten der **ersten Zone** so hygroskopisch, daß ihre Wasseraufnahme praktisch nicht von der Konzentration und der Applikationsart des Wassers abhängt: Sowohl in flüssiger (destilliertes Wasser bzw. Kochsalzlösungen) wie auch gasförmiger (gesättigte Wasserdampfatosphäre) Form wird es von dieser Zone aufgenommen und ausgetauscht. Der Grund dafür liegt möglicherweise darin, daß in dieser Zone die Corneozyten gerade aus dem Stratum Granulosum gebildet wurden und daher ihr Zytoplasma viel osmotisch aktive Komponenten enthält. Hinzu kommt, daß die Cornified Envelope in diesen frühen Stadien noch nicht voll ausgebildet ist, sodaß der Wasseraustausch kaum behindert wird. Die stark abfallende mittlere Dicke von der ersten zur dritten Schicht des Stratum Corneums (vergleiche Abbildung 4.21 auf Seite 84) zeigt deutlich, wie schnell eine effektive Permeabilitätsbarriere in den Corneozyten ausgebildet wird. Insgesamt ist das Hydratationsverhalten dieser Zone recht schwierig zu interpretieren, weil die Corneozyten Wasser sowohl aus den lebenden Schichten des Stratum Granulosum wie auch von Außen (siehe die Ergebnisse der Feuchteammer) aufnehmen kann. Eine hohe Salzkonzentration auf der Hautoberfläche kann Wasser aus den lebenden Schichten extrahieren.

Interessanterweise fällt diese Zone mit einem Bereich zusammen, der teilweise als Stratum Lucidum vom Stratum Corneum abgegrenzt wird. Nur bei sehr dicker Epidermis erscheint dieser Bereich als auffällig heller Streifen in den Bildern optischer Mikroskope. Mit dem Wissen aus den Ergebnissen dieser Arbeiten liegt der Grund möglicherweise in dem großen Wassergehalt und/oder der Wasserkapazität dieser Zellagen, die sich dadurch von den umgebenden Corneozyten durch einen stark veränderten Brechungsindex unterscheiden und so hervorheben.

In der **zweiten Zone** (also ab Schicht 5 bei Oberarmhaut) schließlich scheint die Cornified Envelope vollständig aufgebaut zu sein, denn Corneozyten zeigen hier das geringste hygroskopische Potential im gesamten Stratum Corneum. Auch Keratin und Fillaggrin als wichtige Struktur- und Gerüstproteine können möglicherweise morphologische Veränderungen begrenzen. Die stark von der extern eingestellten Salzkonzentration abhängige Wasseraufnahme in der zweiten Zone deutet auf eine osmotisch aktive Zone hin, bei der die Cornified Envelope eine semipermeable Membran bildet [27]. Möglicherweise werden insbesondere die Ionen der applizierten Lösung daran gehindert, in die Corneozyten einzudiffundieren. Die Tatsache, daß sich in dieser Zone bei Applikation einer 15 %-20 %igen Kochsalzlösung die Wasseraufnahme praktisch nicht mehr ändert, legt nahe, daß die Corneozyten in ihrem osmotischen Potential diesen Salzlösungen ungefähr entsprechen. Die auffallend geringe Dickenvariation kann ihre Ursache in den Intermediärfilamenten und deren Vorzugsrichtung haben: Verlaufen sie hauptsächlich senkrecht zur Corneozytenausrichtung, so wirken sie wie ein starres Skelett und lassen nur eine eng begrenzte Ausdehnung in diese Richtung – und damit Wasseraufnahme – zu. Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht eindeutig abgeklärt, wie sich die Ausrichtung der Intermediärfilamente innerhalb der verschiedenen Schichten des Stratum Corneums verändert.

Zellen der **dritten Zone** zeigen qualitativ die gleiche Reaktion wie solche der zweiten Zone, wenn auch ihre mittlere Dicke insgesamt etwas höher ist. Es handelt sich hier um

Corneozyten, die den direktesten Kontakt mit der Außenwelt haben und daher ist auch der Kontakt mit den verschiedenen konzentrierten Salzlösungen am unmittelbarsten. Hinzu kommt, daß insbesondere der äußere Teil des Stratum Corneums dem stärksten exogenen mechanischen Streß ausgesetzt ist, und daß die extrazellulären Lipidlamellen oxidieren und sich mit den Fettsäuren und Squalenen aus dem Sebum vermischen können. Biochemisch finden hier auch verschiedene enzymatische Abbauprozesse statt [88], [89], [90]; insbesondere werden die Intermediärfilamente bei niedrigen Ionenstärken und einem pH-Wert unter 5,75 aufgelockert [88] – Bedingungen, wie sie natürlicherweise auf der Hautoberfläche vorherrschen. Ein Abbau von Fillaggrin beginnt in der zweiten Zone [69]. Dies bewirkt eine Reorganisation des Zytoplasmas und eine Freisetzung von natürlichen Befeuchtungsfaktoren* ([24], [23]), die in Zone 2 noch durch die Cornified Envelope zurückgehalten werden. Der genaue Einfluß dieser Biomoleküle auf das Quellverhalten wurde aber in dieser Arbeit nicht untersucht.

Insbesondere durch das ähnliche Hydratationsverhalten gehen Corneozyten der dritten Zone wahrscheinlich aus der zweiten Zone dadurch hervor, daß Einflüsse der Hautaußenseite sowie die vielfältigen Abbau- und Degenerationsprozesse die Barriereleistung vermindern und so eine höhere Wasseraufnahmekapazität bewirken. Eine bevorzugte Ausbildung der beschriebenen Wasserkavitäten in dieser Zone läßt zudem auf einen verminderten Zellzusammenhalt schließen. Dies alles macht wahrscheinlich, daß Ionen der extern applizierten Lösung in diese Zone eindiffundieren können, aber durch die weiterhin intakte Barriere der zweiten Zone zurückgehalten werden und das sich so ausbildende Ionenungleichgewicht dort den Corneozyten Wasser entzieht.

Ergebnisse des Kontrollexperimentes Das Kontrollexperiment wurde nicht mit Oberarmhaut, sondern mit Gesichtshaut durchgeführt. Statt typischerweise 15 wies das Stratum Corneum nur 9 Schichten auf – in Übereinstimmung mit den Literaturwerten [38]. Die Hydratation wurde derart durchgeführt, daß ein Wasserinflux ausschließlich durch das Stratum Corneum stattfinden konnte. Die Anzahl der einzelnen Dickenmessungen war geringer und als osmotisch aktive Substanzen wurden nur destilliertes Wasser und eine 20 %ige Kochsalzlösung verwendet. Als Referenzen dienten erneut Proben nach Exposition gegenüber einer gesättigten Wasserdampfatosphäre und solche, die direkt nach Ankunft aus der Transportdose entnommen wurden ("ambiente" Bedingung, die die minimal mögliche externe Hydrierung aufwies).

Bezüglich der Ergebnisse des Hauptexperiments fällt auf, daß insgesamt sämtliche Schichten im Stratum Corneum prozentual weniger Wasser aufgenommen haben (Abbildung 4.22 auf Seite 87 sowie Abbildung 4.23 auf Seite 88). Dies zeigt sich besonders deutlich beim Vergleich zwischen der Wasserdampfatosphäre und dem destillierten Wasser: Während sich die mittlere Dicke der untersten Schicht im Hauptexperiment von 930 ± 310 nm auf 2340 ± 890 nm mehr als verdoppelte, sank sie im Kontrollexperiment sogar von 1330 ± 530 nm auf 880 ± 300 nm ab. Einher geht dies mit der Ausbildung von wesentlich kleineren Segregationsmustern sowie einem seltenerem Auftreten der Wasserkavitäten. Diese morphologi-

* Im Englischen: NMF=Natural Moisturizing Factors.

schen Merkmale deuten auf eine wesentlich geringere Wasseraufnahme in diesen untersten Schichten hin. Im Hauptexperiment konnten die Dermis und die lebenden Bereiche der Epidermis Wasser durch die Seitenwände der Hautstanze aufnehmen und dies dann an das Stratum Corneum weitergeben und so einen indirekten Wassertransportweg, ausgehend von den extern applizierten Medien, bewerkstelligen. Natürlich hydrieren die Corneozyten auch direkt über die Seitenwand der Hautstanze. Im Kontrollexperiment hingegen ist die Wand durch Vaseline vollständig versiegelt, sodaß die oben beschriebenen Penetrationswege verschlossen wurden. Insbesondere den tiefen Schichten des Stratum Corneums wird so weniger Wasser über den Umweg durch das Stratum Granulosum angeboten. Die Folge ist, daß diese Zone im Kontrollexperiment bei Applikation von destilliertem Wasser wesentlich weniger Wasser aufnimmt. Ob es im Vergleich zur Exposition gegenüber einer Dampf-atmosphäre tatsächlich zu einer Schrumpfung kommt, kann aufgrund der geringen Datenlage nicht zweifelsfrei geklärt werden – daher wurde nur das Potential diskutiert.

Trotz dieser Unterschiede spiegeln sich in den Ergebnissen nach Hydratation mit der 20 %igen Salzlösung die bereits diskutierten drei Zonen wieder: Weil die Schichtzahl bei Gesichtshaut geringer ist, umfaßt die erste Zone jetzt nur noch die ersten beiden Schichten. Wie im Hauptexperiment zeichnen sie sich durch eine hohe mittlere Dicke wie auch durch eine hohe Dickenvariation aus. Daran schließen sich die Schichten 4 bis 6 als Mittelzone an, in der die Corneozyten die geringsten Dicken sowie die geringsten Standardabweichungen aufwiesen, die im gesamten Kontrollexperiment registriert wurden. In der äußersten Zone, die ab Schicht 8 beginnt, nahmen diese Werte wieder deutlich zu. Die Übergangsschichten (3 und 7) wurden auch hier nicht weiter analysiert. Im Vergleich mit den Resultaten aus der Feuchtekammer und mit dem destillierten Wasser erscheint die mittlere Dicke in der ersten Zone bei Applikation von 20 % Kochsalzlösung ungewöhnlich hoch (mit die höchste, die in dieser Zone im Kontrollexperiment überhaupt gemessen wurde). Im Hauptexperiment konnte dies problemlos mit eindringendem Wasser durch die Seitenfläche der Hautstanze erklärt werden. Da dies hier nicht zutreffen kann, besteht in diesem Fall die Möglichkeit, daß Wasser aus dem lebenden und damit stark hydrierten Stratum Granulosum in diese Zone diffundiert und dort quasi "gefangen" bleibt. Denn die zweite Zone wirkt als Barriere, weil sie ein vergleichbares osmotisches Potential wie die extern applizierte 20 %ige Kochsalzlösung besitzt und daher osmotisch inaktiv ist. Zudem ist davon auszugehen, daß die Lipidbarriere dieser Zone voll intakt ist. Diese These wird gestützt durch die mittleren Dicken der zweiten Zone, die im ambienten Fall mit denen bei Applikation einer 20 %igen Salzlösung ungefähr übereinstimmt. Dem widersprechen allerdings die Versuche, bei denen die gesamte Hautoberfläche mit Vaseline wasserdicht versiegelt wurden: Hier dient dem Stratum Corneum (und insbesondere der ersten Zone) einzig das Stratum Granulosum als Hydratationsquelle. Trotzdem nahmen die Corneozyten der ersten Zone wesentlich weniger Wasser auf als bei Applikation von 20 %iger Kochsalzlösung, und alle Schichten zeigten eine relativ uniforme Dickenzunahme.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß sich trotz der unterschiedlichen Hautareale und der unterschiedlichen Spender bei Applikation von 20 % Kochsalzlösung stets deutlich die drei Zonen im Stratum Corneum ausbilden. Die Dicke der Corneozyten der mittleren Zone entspricht dabei denen im ambienten Fall. Zusammen mit kleinen Segregationsmu-

stern deutet dies auf eine allenfalls unwesentliche Wasseraufnahme in dieser Zone hin. Bei variablen Salzkonzentrationen zeigen diese Schichten morphologisch die geringste Dickenvariationen. Es ist davon auszugehen, daß die Hautlipide zwischen den Corneozyten nur dann einen wesentlichen Beitrag zur Permeabilitätsbarriere des Stratum Corneums leisten können, wenn sie sich als hochgeordnete Lamellen organisieren können. Verändert sich aber der interzelluläre Abstand der Corneozyten untereinander (beispielsweise durch Dickenveränderung), so wird jedesmal diese Organisation gestört. Es ist daher anzunehmen, daß nur ein mechanisch stabiler Bereich wie die zweite Zone im Stratum Corneum auch den Hautlipiden das Gerüst für eine funktionelle Anordnung bietet. Dies legt die Vermutung nahe, daß sich in dieser Zone die eigentliche Hautbarriere befindet.

Insbesondere an der Wasseraufnahme der ersten Zone kann man den Einfluß der Penetration durch die Seitenfläche der Hautstanze ablesen. Im Kontrollexperiment wird die Fläche versiegelt, sodaß sich an den entsprechenden Ergebnissen das Potential der *Hydratation ausschließlich durch das Stratum Corneum* studieren läßt. Im Hauptexperiment wird mit der Seitenfläche ein zusätzlicher Penetrationsweg eröffnet, sodaß hieran das *maximale Hydratationspotential* abgelesen werden kann.

5.2.3 Glycerinexperiment

Beim Glycerinexperiment wurde erneut Gesichtshaut, allerdings von einer anderen Spenderin, verwendet. Es wurden hauptsächlich morphologische Veränderungen untersucht und im Vergleich zu dem Haupt- und Kontrollexperiment weniger Dickenmessungen durchgeführt. Folglich ist die Standardabweichung des Mittelwertes deutlich höher (Abbildung 4.24 auf Seite 89), die aber – wie bereits diskutiert – nicht als Meßfehler zu interpretieren ist, sondern als intrinsische biologische Streuung der Schichtdicken.

Im Gegensatz zur Applikation von hochkonzentrierten Salzlösungen bildet sich offenbar keine Schicht aus, in der die Corneozyten praktisch alle die gleiche Dicke mit nur geringen Variationen haben. Bei Glycerinapplikation von 2 bzw. 6 Stunden ändert sich – im Rahmen der Messungen – diese Variation nicht. Obwohl morphologisch Glycerineinlagerungen zwischen Corneozyten zu identifizieren sind (vergleiche Abbildung 4.18 auf Seite 82) scheint das bei diesen Applikationsdauern noch keinen wesentlichen Einfluß auf die Schichtdicken zu haben. Entsprechend treten offenbar auch keine starken mechanischen Kräfte auf, wie es bei niedrigkonzentrierten Kochsalzlösungen der Fall war und das Stratum Corneum bleibt ein eng zusammenhängender Zellverband.

Die Beobachtung, daß das Stratum Corneum bis in die tiefsten Schichten wesentlich weniger Gefrierartefakte aufweist, hat seine Ursache in der cryoprotektiven Wirkung von Glycerin, das seit langem als größtenteils nichttoxischer Gefrierschutz eingesetzt wird ([91], [92], [53]). Indirekt ist dies auch ein Beweis, daß bei einer topischen Applikation Substanzen (Glycerin, niedrigkonzentrierte Kochsalzlösungen) in das Stratum Corneum eindringen können und sich dort sowohl homogen als auch lokal konzentriert (Glycerineinschlüsse, Wasserkavitäten) anreichern können. Abgesehen von dieser Wirkung als Gefrierschutz konnten in dieser Arbeit keine weiteren makroskopischen Einflüsse registriert werden.

5.2.4 Vergleich mit *In vivo* - Daten

MultiPhotonen-LaserRasterMikroskopie

Das Hydratationsverhalten des Stratum Corneums wurde bereits mittels eines MultiPhotonen-LaserRasterMikroskops (englisch: MultiPhoton Laser Scanning Microscope MPLSM) analysiert [93]. Dabei wurde der Unterarm zweier männlicher Probanden (40 Jahre und 62 Jahre) sowie einer weiblichen Probandin (35 Jahre) *in vivo* für 2 und 4 Stunden mit 0%iger, 5%iger, 10%iger und 20%iger Kochsalzlösung behandelt und danach die Gesamtdicke des Stratum Corneums vermessen. Als Referenz diente unbehandelte (ambiente) Haut. Innerhalb der Toleranz konnte keine Abhängigkeit von der Behandlungsdauer nachgewiesen werden. Diese Werte sind gemeinsam mit den Ergebnissen aus dem Haupt- und Kontrollexperiment (dabei werden nur die Summen der ersten 15 bzw. 9 Schichten beachtet) in Abbildung 5.2 auf der nächsten Seite zusammengestellt. Im *in vivo*-Experiment fällt die Gesamtdicke des Stratum Corneums stetig mit steigender Salzkonzentration stark ab und unterschreitet bei 20% deutlich die der ambienten Referenz.

Wirklich ambiente Kontrollproben standen in dieser Arbeit nur aus *In vivo* - Extraktionen und damit in zu beschränktem Umfange zur Verfügung, um daraus Hydratationsexperimente mit einer adäquaten statistischen Auswertung durchführen zu können. Daher stützen sich die hier diskutierten Ergebnisse auf die Haut der Privatklinik, die entweder für 12 Stunden einer definierten gesättigten Wasserdampf-atmosphäre ausgesetzt wurde (Referenz im Hauptexperiment) oder durch die Anlieferung in der Transportdose einer Feuchtigkeitsatmosphäre ausgesetzt war (Referenz im Kontrollexperiment). Im Hauptexperiment zeigt die Gesamtdicke der ersten 15 Schichten bei niedrigen Salzkonzentrationen (bis 10%) durchgängig geringere Werte als für die MPLSM-Messungen. Der Grund liegt möglicherweise darin, daß die Referenzproben im Hauptexperiment durch die Wasserdampf-atmosphäre wesentlich stärker hydriert wurden. Da alle Werte in Abbildung 5.2 darauf bezogen werden, hätte dies grundsätzlich eine geringere prozentuale Quellung zur Folge als bei einer nicht hydrierten Referenz (wie es bei den MPLSM der Fall ist). Dem entgegen stehen allerdings die Ergebnisse bei 20% NaCl: Während die Gesamtdicke im Hauptexperiment praktisch wieder den Referenzwert erreicht, wird er bei der mpLSM-Untersuchung deutlich unterschritten. Auch dort scheinen die gemessene Dicken kontinuierlich mit der Salzkonzentration abzufallen, während die Ergebnisse aus dem Hauptexperiment oberhalb von circa 10% einem konstanten Wert entgegenstreben.

Daß die Gesichtshaut im Kontrollexperiment eine geringere Anzahl von Stratum Corneum-Schichten aufweist als die Ober- bzw. Unterarmhaut vom Haupt- bzw. MPLSM-Experiment, sollte in der Vergleichbarkeit der Daten keinen Einfluß haben. In diesem Fall wurden nämlich die ersten 9 Schichten der Referenzproben in ihren Dicken aufsummiert und als 100% angesetzt. Als Referenz dienten hier Proben, die direkt der Transportdose entnommen wurden und gefroren wurden. Sie waren daher weniger hydriert als im Hauptexperiment, aber stärker als im MPLSM-Experiment. Bei Applikation von destilliertem Wasser und 20%iger Kochsalzlösung zeigte sich in Abbildung 5.2 auf der nächsten Seite die stärkste Dickenzunahme, die bei diesen Konzentrationen überhaupt gemessen wurde. Allerdings

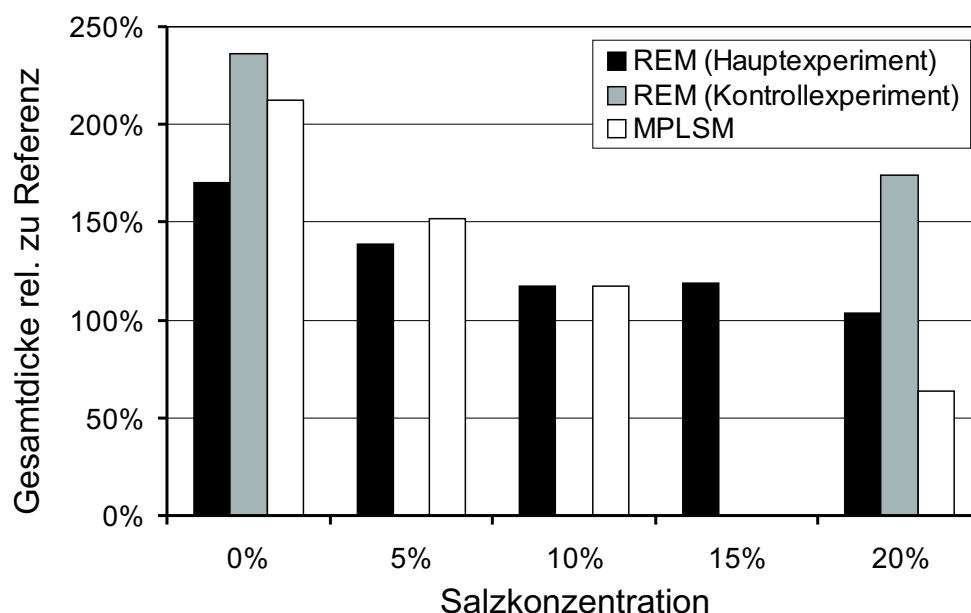


Abbildung 5.2: Vergleich der Hydratationsergebnisse mit *In vivo* - Daten, bezogen auf die jeweilige Referenz (stets auf 100 % normiert). Im Hauptexperiment sind dies Proben nach Einwirken einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre für 12 Stunden. Es wurden die Gesamtdicken der ersten 15 Schichten ausgewertet. Für das Kontrollexperiment wurden die ersten 9 Schichten analysiert. Als Referenz dienten die Proben, die direkt aus der Transportdose entnommen wurden. In den Ergebnissen des MultiPhotonen-LaserRasterMikroskops (MPLSM) wurden ambiente Proben des gesamten Stratum Corneum als Referenz herangezogen.

wurden in diesem Kontrollexperiment relativ wenige Messungen durchgeführt.

Gemeinsam ist allen Daten, daß diese Dicke bei Applikation von destilliertem Wasser maximal ist und dann mit steigender Salzkonzentration deutlich abnimmt. Die genaue Abhängigkeit in den Zahlenwerten der *in vivo*-Messungen unterschied sich dabei aber von den beiden elektronenmikroskopischen Untersuchungen, obwohl unterschiedlich hydrierte Referenzproben verwendet wurden und auch das Layout der Quellung variiert wurde (Abbildung 3.1 auf Seite 46).

Unter Zugrundelegung aller Daten läßt sich noch nicht der Einfluß der unterschiedlichen Hautareale (Unter- und Oberarm, Gesicht) sowie Alter und Geschlecht der Probanden abschätzen. In den Dickenmessungen der einzelnen Schichten des Stratum Corneum macht aber die Standardabweichung bereits 25 % bis 40 % des Mittelwertes aus. Dieser "Fehler" läßt sich nicht durch eine höhere Zahl von Einzelmessungen reduzieren, denn er beschreibt die biologische Variabilität im Gesamtsystem Haut. Hinzu kommt, daß sich die Ergebnisse dieser Arbeit nur auf die ersten 15 bzw. 9 Schichten beziehen. In Übereinstimmung mit der Literatur ([38]) zeigten sich auch in den präparierten Querschnittsflächen selten mehr Schichten. Die Möglichkeit des Verlustes insbesondere der äußeren Schichten des Stratum

Corneums durch die Präparation kann weitestgehend dadurch ausgeschlossen werden, daß regelmäßig in den Aufnahmen die Hautoberfläche eindeutig identifiziert werden konnte. Im Gegensatz zur Präparation bei beispielsweise der chemischen Fixation oder Gefriersubstitution konnte so das gesamte Stratum Corneum zuverlässiger erhalten und der Untersuchung zugänglich gemacht werden. Auch die Möglichkeit, daß sich die Haut nach 12 Stunden Applikationsdauer nicht im Hydratationsgleichgewicht befunden hat, kann ausgeschlossen werden: Die MPLSM-Untersuchungen ergaben nämlich bereits nach 2 und 4 Stunden Applikationsdauer keine meßbaren Dickenveränderungen mehr.

Ein anderer Unterschied liegt in den verschiedenen physikalischen Verfahren der mikroskopischen Abbildung: Während die Rasterelektronenmikroskopie eine direkte Abbildung der präparierten Oberflächen samt geometrischer Vermessung der einzelnen Substrukturen erlaubt, ist die MPLSM ein optisches Verfahren, das sowohl Oberflächen- als auch Bilder in der Tiefe der Probe (optische Schnitte) aufnehmen kann. Bei Applikation von verschiedenen Salzlösungen und insbesondere der Ausbildung der Wasserkavitäten bei niedrigkonzentrierten Salzlösungen (vergleiche Abbildung 4.16 auf Seite 80) verändert sich der Brechungsindex sowie das Streuverhalten der durchstrahlten Strukturen – in diesem Fall also des Stratum Corneums – und damit potentiell auch die Brechkraft und der Focus. Praktisch läßt sich der Einfluß auf die Meßergebnisse schwer abschätzen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß einzelne Corneozyten nur nach Behandlung der Haut mit wässrigen Lösungen zu identifizieren waren. Vermutet wird, daß sie dann durch die Ausbildung von Wasserkavitäten stellenweise oben und unten nur von Wasser umgeben aber ansonsten isoliert voneinander im Fokus waren, der in z -Richtung eine Ausdehnung von ungefähr $1,5\ \mu\text{m}$ hat.

Raman-Mikroskopie

Caspers *et al.* [87] untersuchte mittels Ramanmikroskopie Wasserprofile des Stratum Corneums im ambienten Fall und nach 45 Minuten Hydratation per "feuchter Bandage". Der Wassergehalt wurde aus dem Verhältnis der Streckschwingungen der C-H Bindungen (determiniert unter anderem durch den Gehalt an Proteinen) zu denen der O-H Bindungen (abhängig unter anderem vom Wassergehalt) berechnet. Die Auflösung in z -Richtung lag bei $5\ \mu\text{m}$, sodaß keine Aussagen über einzelne Schichten oder einzelne Zonen gemacht werden konnten. Auch eine klare Abgrenzung der Ergebnisse des Stratum Corneums von denen der lebenden Epidermis konnte nur näherungsweise über die Tiefe, nicht aber morphologisch, erfolgen. Bei Hydratation steigt der Wassergehalt im Bereich des Stratum Corneums von 10 %-30 % deutlich auf 40 % bis 60 %. Hingegen bleibt der Wassergehalt in der tiefen Epidermis- und Dermisregion konstant bei 70 %.

5.2.5 Vergleich mit anderen EM-Untersuchungen zum Hydratationsverhalten

Warner *et al.* ([6]) untersuchte ebenfalls das Quellverhalten des Stratum Corneums mittels cryopräparierter Haut (von der körpernahen (flexor) Unterarmseite) im Elektronenmi-

kroskop. Dabei wurde die Hydratation *in vivo* durch sogenannte *Hilltop patches* gewährleistet, die die Hautoberfläche direkt in Kontakt mit der Flüssigkeit bringen. Hydriert wurde 4 und 24 Stunden mit destilliertem Wasser und Eigen-Urin* (leider dokumentiert Warner dabei weder die Konzentration oder den genauen Salzgehalt). Aus dem behandelten Hautareal wurden dann Hautbiopsien entnommen und einerseits chemisch fixiert, in Kunststoff eingebettet und als Ultradünnschnitte im Transmissionselektronenmikroskop analysiert sowie andererseits im gefroren hydratisierten Zustand mittels Glasmesser im Cryo-Ultramikrotom Querschnitte angefertigt und im Rasterelektronenmikroskop mikroskopiert.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit berichtet Warner *et al.* bei Applikation von destilliertem Wasser von zahlreichen Wassereinschlüssen mit ausgeprägter Größenvarianz, die sich bevorzugt im oberen Teil des Stratum Corneums finden und dessen Zusammenhalt zerstören. Berichtet wird ferner, daß insbesondere das mittlere Stratum Corneum eine sehr starke Quellung aufweist, die innersten und äußersten Corneozytenlagen hingegen die dünnsten waren. Diese Beobachtungen widersprechen somit den Messungen im Rahmen dieser Dissertation. Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird allerdings erschwert dadurch, daß die präparierten Hautquerschnitte von Warner keine statistische Aussagen zulassen, da die Haut größtenteils gebrochen und nur kleine Bereiche geschnitten wurden[†] (vergleichbar mit Abbildung 4.1b auf Seite 63 in dieser Arbeit oder in der Arbeit von Warner *et al.*). Großflächige Übersichten zur Beurteilung der Gesamtmorphologie fehlen.

In den Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation war es für eine korrekte Zuordnung von Zellschichten absolut notwendig, die letzten Schichten des Stratum Granulosum klar von den ersten des Stratum Corneums abzugrenzen. Die Kriterien waren dabei das Fehlen von Zellkernen und Organellen, ein charakteristisches Segregationsmuster sowie schärfere Zellgrenzen im Stratum Corneum (vergleiche Abschnitt 3.2.5 und insbesondere Abbildung 3.7 auf Seite 53). Bei der Arbeit von Warner wird auf diese Differenzierung überhaupt nicht eingegangen, sodaß letztlich unklar bleibt, ob er eventuell die zwei bis drei stark hydrierten Corneozytenschichten der ersten Zone noch zum Stratum Granulosum gezählt hat oder nicht. Die sich daran anschließende zweite Zone zeichnet sich nämlich tatsächlich durch auffällig dünne und kompakte Schichten aus (vergleiche Abbildung 4.19c auf Seite 82 sowie Abbildung 4.20 auf Seite 83 bzw. Abbildung 4.21 auf Seite 84). Zudem zeigen die Ergebnisse von Pfeiffer *et al.* (Abbildung 1b und 7 in [69]), daß die untersten Schichten des Stratum Corneums von ambienter Haut verhältnismäßig dick und aufgelockert sind. Es ist nicht nachzuvollziehen, warum sich dies bei Applikation von destilliertem Wasser ins Gegenteil umkehren soll.

Dadurch, daß bei Warner die Haut zunächst hydriert und dann erst die Biopsien entnom-

* 24 Stunden Urin eines gesunden menschlichen Erwachsenen besteht hauptsächlich aus Harnstoff (200–600 mmol), Chloridionen (120–240 mmol), Natriumionen (60–200 mmol), Kaliumionen (30–100 mmol), Aminosäuren (260 mg) und bis zu 150 mg Gesamteiweiß [94] und ist in seiner genauen Zusammensetzung stark abhängig von der aktuellen Wasserversorgung des Körpers und eventuellen Krankheiten.

† höchstwahrscheinlich durch die Verwendung eines Glasmessers anstatt eines Trimmdiamanten oder eines speziellen Schneidediamanten.

men wurden, besteht grundsätzlich die Gefahr, daß die obersten (lockersten) Schichten des Stratum Corneums verloren gehen. Das hat sich im Rahmen dieser Arbeiten bereits *in vivo* nach 2 Stunden Hydratation erwiesen und war der Grund, warum zuerst die Hautstanzen entnommen wurden und diese danach befeuchtet wurden. Insofern bleibt unklar, ob die von Warner beschriebenen äußeren dünnen Schichten auch real die äußersten Schichten sind. Bei den eigenen Untersuchungen fanden sich nämlich immer wieder auffällig dünne und kompakte Corneozyten im äußeren Bereich des Stratum Corneums sowohl in den REM wie auch in den TEM Untersuchungen. Allerdings konnten diese Bereiche (oberhalb von Schicht 15 bei Oberarmhaut und oberhalb von Schicht 9 bei Gesichtshaut) zu selten erhalten, präpariert und mikroskopiert werden, weil der Zusammenhalt dort zu lose ist. Aufgrund der zu geringen Daten schloß sich eine statistische Analyse aus. Leider macht Warner in seiner Arbeit keine Angaben über die Häufigkeit des Auftretens dieser dünnen Schichten.

Grundsätzlich sind die eigenen Arbeiten und die von Warner dahingehend vergleichbar, daß in beiden Fällen von den gefroren hydratisierten Proben Querschnitte angefertigt wurden und im Elektronenmikroskop untersucht wurden. Die Querschnittsflächen erreichten aber bei Warner nicht die Größe und Homogenität der vorliegenden Arbeit, wodurch Morphologieuntersuchungen auf großen Flächen und statistische Aussagen nicht möglich wurden. Insbesondere in der eigenen Arbeit hat sich gezeigt, wieviel biologische Variabilität das Stratum Corneum intrinsisch zeigt und daß dadurch eine Analyse und Interpretation einzelner Bilder oder Proben einen sehr spekulativen Charakter bekommt. Aussagen über das "untere Stratum Corneum" machen ferner eine eindeutige Abgrenzung vom Stratum Granulosum notwendig, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen. In dieser Arbeit war dies – nicht zuletzt durch die großen Querschnittsflächen – reproduzierbar möglich; bei Warner fehlen entsprechende Angaben. Durch die diskutierten methodischen Unterschiede ist ein Vergleich der Ergebnisse mit den eigenen schwierig.

Durch **Bouwstra *et al.*** ([7]) wurde ebenfalls das Hydratationsverhalten der Corneozyten untersucht. Dazu wurde Bauch- oder Brusthaut von kosmetischen Operationen auf der Dermisseite mit Trypsin* in Kontakt gebracht, um danach das Stratum Corneum ablösen zu können. Das so isolierte Stratum Corneum wurde für jeweils 24 Stunden über Silica Gel getrocknet oder über destilliertem Wasser oder Salzlösungen hydriert, anschließend gewogen und auf einem Halter festgefroren. Außer bei den Proben, die über destilliertem Wasser hydriert wurden, mußte dafür ein Gewebe-Einbettmedium (TBS, eine Mischung aus Polyvinylalkohol, Carbowax und anderen nichtreaktiven Substanzen) verwendet werden. Die Hautaußenseite konnte dann nicht mehr von der epidermalen Seite unterschieden werden. Mithilfe des Halters wurden die Proben dann in flüssigem Propan plungegefroren, danach Querschnitte mit einem Diamantmesser angefertigt und diese schließlich mikroskopiert. Parallel dazu wurden auch ganze Hautstücke wie vorher beschrieben in einer gesättigten Wasserdampfatmosfera hydriert und ebenfalls plungegefroren, geschnitten und mikroskopiert.

Nach Hydratation über destilliertem Wasser vervierfachte sich die Masse des isolierten

* ein eiweisspaltendes Enzym, das auch im menschlichen Magen und Dünndarm vorkommt.

Stratum Corneums und es werden häufig Wassereinschlüsse zwischen den Corneozyten von unterschiedlicher Größe beobachtet. Es wird ferner berichtet, daß die inneren und äußeren Bereiche am wenigsten gequollen sind, während die Zentralregion die stärkste Wasseraufnahme zeigt – in den veröffentlichten Bildern besteht diese "Zentralregion" allerdings teilweise nur aus einer einzigen Corneozytenschicht und es wird nicht berichtet, wieviel Zellschichten sie typischerweise umfaßt. In den eigenen Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation wurden auch immer wieder einzelne Corneozyten in unterschiedlichen Tiefen des Stratum Corneums beobachtet, die sich durch eine auffallend geringe Dicke und/oder ein deutlich unterschiedliches Segregationsmuster von den direkt benachbarten Zellen unterscheiden. Allerdings war ihre Häufigkeit in der statistischen Auswertung viel zu gering, um ihnen eine reale morphologische Bedeutung zuordnen zu können. Vermutlich handelt es sich hier nur um besonders extreme Beispiele der biologischen Variabilität – denn ungefähr gleich häufig wurden auch außergewöhnlich dicke Corneozyten im Stratum Corneum beobachtet.

Zudem sind die Hydratationsexperimente von Bouwstra *et al.* kritisch zu bewerten, da hier zunächst das Stratum Corneum enzymatisch abgedaut wurde. Es ist noch nicht genau geklärt, ob so exakt die lebenden Schichten des Stratum Granulosums von den toten Schichten des Stratum Corneums separiert werden können oder ob auf diese Weise auch einige Corneozytenschichten mit entfernt werden. Zudem ist völlig unklar, welchen Einfluß diese Behandlung auf das Hydratationsverhalten hat – deswegen wurde auch im Rahmen dieser Dissertation von einer Enzymbehandlung vollständig abgesehen. Um den Einfluß beurteilen zu können, wurden von Bouwstra *et al.* auch vollständige Hautstanzen über destilliertem Wasser hydriert und präpariert – in den beiden in [7] gezeigten Bildern haben aber alle Schichten des Stratum Corneums vergleichbare Dicken. Stattdessen wird ein unterschiedlicher Wassergehalt durch den unterschiedlichen Kontrast der einzelnen Schichten begründet, was aber bei elektronenmikroskopischen Bilder sehr spekulativ ist, da der Kontrast von vielen anderen Faktoren abhängt (Flächenkontrast, Bedampfungsgeometrie der Oberfläche, Art des Elektronendetektors; siehe Abschnitt 2.2.3 ab Seite 16), eine Diskussion dieser Einflußgrößen fehlt aber bei Bouwstra *et al.*

Bei Hydratation über verschiedenen Salzlösungen (27%ige NaBr-Lösung bzw. gesättigte Natriumcarbonatlösung) war eine 18%ige bis 26%ige bzw. 57%ige bis 87%ige Gewichtszunahme beobachtet worden. Während sich im ersten Fall eine homogene Wasseraufnahme einstellte, berichten Bouwstra *et al.*, daß das mittlere Stratum Corneum nach Hydratation über Natriumcarbonat einen hohen Kontrast im Mikroskop sowie stark geschwollene Corneozyten zeigt. Die gezeigten Bilder scheinen dies auch teilweise zu belegen. Allerdings wurden diese Proben vor dem Gefrieren auf dem Probenhalter mittels eines Gewebe-Einbettmediums fixiert. Es ist bekannt, daß dies einerseits das Hydratationsverhalten verändern kann und andererseits vor mechanischen Zerstörungen durch wachsende Eiskristalle schützt, indem es die Unterkühlbarkeit des Gewebewassers erhöht [55], [58]. Insbesondere wegen der unvorhersehbaren Veränderung des Hydratationsverhaltens wurde bei den eigenen Untersuchungen auf jegliche Chemikalien verzichtet und die Proben bei der Präparation ausschließlich mechanisch mittels Schrauben geklemmt. Auch die eigenen Arbeiten mit Glycerin – einer Substanz mit bekannt cryoprotektiver Wirkung –

zeigen eine deutliche Verminderung der Gefrierartefakte in den Corneozyten (wie bereits in den Resultaten ab Seite 79 vorgestellt). Bouwstra diskutiert eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse nicht; es ist aber anzunehmen, daß insbesondere die äusseren Bereiche des isolierten Stratum Corneums mit dem Einbettmedium in Kontakt kommen und es aufnehmen, wohingegen der Mittelteil relativ unbeeinflusst bleibt. Dies wiederum kann die geringere Quellung der Außenbereiche im Vergleich zum Mittelteil sowie die unterschiedlichen Signalausbeuten (und somit den anderen Kontrast) dieser Bereiche erklären.

Die Arbeiten von Bouwstra *et al.* geben neue Einblicke in das Hydratationsverhalten der Corneozyten – insbesondere weil die einhergehende Gewichtszunahme dokumentiert werden konnte. Unvermeidbar ist dabei die enzymatische Ablösung des Stratum Corneums, die allerdings Artefakte beinhalten kann. Eine Vergleichbarkeit zu den eigenen Ergebnissen wird insbesondere erschwert, da sich sicherlich das Hydratationsverhalten von isoliertem Stratum Corneum von dem in einer Hautstanze (wie sie in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurde) unterscheiden wird*. Zudem befeuchteten Bouwstra *et al.* die Proben ausschließlich über die Gasphase, während in dieser Arbeit hauptsächlich Flüssigkeiten direkt appliziert wurden. Übereinstimmend kam es bei der stärksten Hydrierung zur Ausbildung zahlreicher Wassereinschlüsse. Ansonsten ist eine Vergleichbarkeit der Daten durch die gänzlich andere Probenpräparation nur schwer möglich.

5.3 Stratum Corneum-Integrität

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zur Hydratation des Stratum Corneums ist deutlich geworden, daß die Verklammerungen und die Desmosomen für die strukturelle Integrität verantwortlich sind. Wassereinlagerungen zwischen den Corneozyten-Schichten führt zu einer Zerstörung dieser Strukturen, wobei allerdings die Verklammerungen häufig noch den letzten mechanischen Kontakt herstellen.

In diesem Zusammenhang ist wichtig anzumerken, daß nicht nur ein zu hoher sondern auch ein zu geringer Feuchtegehalt Auswirkungen auf die mechanische Stabilität hat: So hat Nicolopoulos *et al.* in [95] untersucht, bei welchen Kräften es zu Rissen in isoliertem Stratum Corneum kommt und mit welcher Geschwindigkeit sie sich ausbreiten. Wird es bei einer Luftfeuchtigkeit von 35 % hydriert, so treten Brüche im Stratum Corneum bei relativ geringen Kräften ($0,6 \text{ kJ/m}^2$) auf und propagieren sehr schnell (2 s für 10 mm). Wurde das Stratum Corneum aber bei 85 % Luftfeuchtigkeit hydriert, so erhöhen sich die Bruchkräfte bis $4,5 \text{ kJ/m}^2$, während sich die Bruchgeschwindigkeit deutlich vermindert (bis 52 s für 10 mm). Laut Nicolopoulos sind diese Werte vergleichbar mit denen von stabilen Polymeren, wie z.B. Polytetrafluorethylen (PTFE).

Diese Untersuchungen zeigen, daß ein optimaler Wassergehalt im Stratum Corneum existiert, der mittels Hydratation durch die lebenden Schichten der Epidermis aufrecht erhalten wird. Ein zu hoher Wassergehalt führt zu Wassereinlagerungen zwischen den Cor-

* Im letzteren Fall kann die Epidermis und Dermis als Wasserspeicher und -senke wirken. Weil dies auch im natürlichen Verbund der Haut der Fall ist, ist dieser Aufbau realitätsnäher als bei isoliertem Stratum Corneum.

neozytenschichten und einer Zerstörung des Zusammenhaltes. Bei einem zu geringen Wassergehalt verliert das Stratum Corneum hingegen einen Großteil seine Reißfestigkeit und Flexibilität.

5.4 Klinische Bedeutung der Hydratationsergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Permeationsbarriere des Stratum Corneums wahrscheinlich in der zweiten Zone liegt. Sie hat größenordnungsmäßig die Osmolarität einer 15 bis 20 %igen Kochsalzlösung. Dies gibt einen Erklärungsansatz, warum bei Psoriasis*-Patienten eine (wenn auch auf 10-14 Tage zeitlich begrenzte) Besserung der Symptome eintritt, die ein Bad in ungefähr der gleichen Salzkonzentration nehmen[†]. Wahrscheinlich wird dadurch die Integrität des Stratum Corneum als Ganzes erhöht.

Die erstaunliche Stabilität der zweiten Zone erklärt ferner die Schwierigkeiten, die topisch applizierte Substanzen bei der Penetration durch die Haut haben (500 Dalton Regel [98]). Penetrationsbeschleuniger müssen daher in dieser Zone wirken, beispielsweise durch eine Störung – nicht aber einer Zerstörung – der Integrität mittels niedriger Osmolaritäten. Um den transepidermalen Wasserverlust durch eine Verstärkung der Permeationsbarriere zu verringern, muß hingegen stabilisierend auf die zweite Zone eingewirkt werden.

* Psoriasis (Schuppenflechte): chronische Hauterkrankung, die circa 3% der Mitteleuropäer betrifft. Durch eine ungefähr siebenfach schnellere Zellteilung im Stratum Basale verhornen die Corneozyten nicht mehr ausreichend. Sie ist angeboren, kann aber lange verborgen bleiben und/oder Generationen überspringen [96], [97].

† Anwendungsempfehlung: auf 6 bis 10l Badewasser 1,5kg PSORI-SAL, einer Mischung hauptsächlich verschiedener Chloridsalze. Dies entspricht einer Salzkonzentration von 15% bis 25%. Hersteller: Psorimed, <http://www.psorimed.com>, psorimed-berlin@freenet.de

Kapitel 6

Ausblick

Die im Rahmen dieser Dissertation entwickelten Präparationstechniken haben neue Untersuchungen an menschlicher Haut möglich gemacht und so einige offene Fragen beantworten können. Allerdings sind dadurch – wie auch häufig in vielen anderen wissenschaftlichen Disziplinen zu beobachten – völlig neue Fragen entstanden, die nun der Beantwortung harren. Zusammen mit möglichen Verbesserungen der Präparation sollen diese hier kurz vorgestellt und diskutiert werden.

6.1 Präparation

Bei den durchgeführten **Gefriersubstitutionen** hat sich gezeigt, daß insbesondere das Stratum Corneum nur unzureichend erhalten blieb. Die Vermutung, daß dies an einer zu geringen Primärfixierung durch das Uranylacetat lag, hat sich in ersten Vorversuchen bestätigt: Eine Zugabe von 1 % Osmiumtetroxid im ersten Substitutionsschritt und eine vollständige Auswaschung in den weiteren Schritten scheint den Zusammenhalt der Corneozyten untereinander wie auch die extrazellulären Lipide im Stratum Corneum zuverlässiger zu erhalten, ohne dabei durch eine zu starke Schwärzung der Probe die UV-Polymerisation zu behindern.

Bei den gefroren hydratisierten Proben (seien sie jetzt hochdruckgefroren oder plungegefroren) stellte die Kontamination der präparierten Oberfläche mit Wasser beim **Transfer vom Cryo-Ultramikrotom** in das Vakuum der Gefrierätzanlage stets das größte Problem dar. Auch das Transfersystem, durch das die Probe ausschließlich Kontakt mit gasförmigem Stickstoff auf Raumtemperatur hat, konnte die Kontaminationen nur vermindern. Wahrscheinlich befanden sich in dem Gas noch Reste von Wasser, das sich dann natürlich am kältesten Punkt – also der gefrorenen Probe selbst – niederschlägt. Wünschenswert wäre eine Aufnahme der Probe direkt aus dem Cryo-Ultramikrotom unter einer Atmosphäre aus *kalt* gasförmigem Stickstoff in das Transfersystem. Das hätte einerseits den Vorteil, daß sich eventuelles gasförmiges Wasser bereits niedergeschlagen hätte und andererseits eine Zwischenlagerung in flüssigem Stickstoff entfallen würde, was zudem den mechanischen Streß der Probe – beispielsweise durch Temperaturschwankungen – vermindern würde.

6.2 Mikroskopie und Auswertung

Durch die benutzte Kipprotationsbedampfung ist es prinzipiell möglich, nach der Abbildung im Rasterelektronenmikroskop den Platin-Kohlenstoff-Film von der Probe zu trennen, aufzureinigen und als **Replika im Transmissionselektronenmikroskop** zu mikroskopieren. Die Schichtdicken wurden bewußt so dick gewählt, um die notwendige mechanische Stabilität zu gewährleisten (sogar eine Kohlenstoffschicht von 80 nm ist durchstrahlbar gewesen). Dies ermöglicht eine vergleichende Abbildung der *gleichen* Probe durch unterschiedliche Elektronenmikroskope und eine Langzeitlagerung als Replika.

Würde im Gegenteil nur die Oberfläche im Cryo-Ultramikrotom präpariert aber nicht mit Schwermetallen oder Kohlenstoff bedampft, so kann man mittels energiedispersiver Röntgenanalyse (**EDX**) auch Elementverteilungen in der Haut visualisieren.

Die zonal unterschiedliche Wasseraufnahme der Corneozyten legt die Frage nach dem Grund dafür nahe. Wie bereits diskutiert, kann dies unter anderem in einer unterschiedlichen **Orientierung der Intermediärfilamente** begründet sein. Eine Analyse in Abhängigkeit von der Schichtdicke kann darüber Aufschluß geben. Zusammen mit den Intermediärfilamenten spielen auch die **extrazellulären Lipide** für das Hydratationsverhalten eine entscheidende Rolle. Neben einer Untersuchung ihrer allgemeinen Organisation im Stratum Corneum ist dies insbesondere in der zweiten Zone von Interesse, weil diese sich durch ihre besondere Stabilität auszeichnet.

Eine schnellere und objektivere Auswertung der Zelldicken anhand der elektronenmikroskopischen Bilder ist nur durch eine **computergestützte Auswertung** möglich. Ein entsprechendes Programm ist inzwischen entwickelt und einsatztauglich. Dies sollte unmittelbaren Einfluß auf die Erhebung von statistischen Daten haben.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine seit längerem bestehende Cryopräparationstechnik [8] weiterentwickelt, um erstmals statistische Daten über das Hydratationsverhalten und morphologische Parameter verschiedener Schichten des Stratum Corneums erheben zu können. Dazu mußte ein hoher Probendurchsatz, relativ große Probenareale und eine adäquate Mikroskopietechnik miteinander verbunden werden. Ein Ziel war dabei, das Hydratationsverhalten durch die Präparation zuverlässig zu erhalten. Damit schloß sich eine chemische Fixierung und die Benutzung eines chemischen Gefrierschutzes aus. Stattdessen wurde die Haut mittels Plungegefrierens inaktiviert und auch die weitere Präparation erfolgte auf rein physikalischem Wege. Durch Tieftemperatur-Ultramikrotomie konnten reproduzierbar große Querschnittsflächen quer durch die 3 mm Hautstanzen angefertigt werden. Ein anschließendes partielles Gefrierätzen legte Strukturen im subzellulären Bereich (Filamente, Desmosomen) offen. Eine Beschichtung der Querschnittsfläche mit 6 nm Platin oder Wolfram und 40 nm Kohlenstoff unter Kipprotation gewährleistete bei Detektion der Rückstreuelektronen die notwendige Detailgenauigkeit. Begleitend wurden auch Hautproben hochdruckgefroren und gefriersubstituiert, um die Strukturhaltung zu validieren und den möglichen Einfluß der jeweiligen präparativen Artefakte einschätzen zu können.

Durch diese speziell an Biopsien angepasste Probenpräparation wurden statistische Aussagen zum Hydratationsverhalten des Stratum Corneums möglich. Dabei wurde destilliertes Wasser, Salzlösungen verschiedener Konzentrationen sowie eine gesättigte Wasserdampf-atmosphäre für 12 Stunden auf frische Hautbiopsien appliziert. Bei destilliertem Wasser und Kochsalzkonzentrationen unter 5% kam es – in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Warner [6] und Bouwstra [7] – zur Ausbildung von Wasserkavitäten zwischen den Corneozyten mit Größen bis zu 25 µm im oberen Stratum Corneum, die die strukturelle Integrität stark stören. Ihre Größe wird offenbar durch die Osmolarität der extern applizierten Flüssigkeit bestimmt, während ihre Häufigkeit von der Menge des eindringenden Wassers abhängt. Die entwickelte Probenpräparation machte insbesondere statistische Aussagen möglich. So hat sich gezeigt, daß selbst innerhalb des gleichen Hautareals die Corneozytendicken der *gleichen* Schicht im Stratum Corneum natürlicherweise um bis zu 40% (Anteil der Standardabweichung vom Mittelwert) schwanken können. Die mittlere Dicke kann durch Hydratation (je nach Zone) bis zu 200% zunehmen. Somit werden die

widersprüchlichen Literaturwerte zum Wassergehalt des Stratum Corneums von 10 %-20 % bei *ex vivo* Untersuchungen ([21], [22]) bis hin zu *in vivo*-Raman Werten von 35 % ([23], [24]) verständlich.

Durch die Ausbildung der Wasser- und Glycerinkavitäten und die wesentlich vermindernten Gefrierartefakte bei Glycerinzugabe konnte ein Penetrieren der extern applizierten Lösungen nachgewiesen werden. Die Veränderung der Dicken der Corneozyten sowie ihres Segregationsmusters zeigte zudem auch quantitativ eine deutlich inhomogene Hydratation innerhalb des Stratum Corneums. Dabei konnten drei Zonen identifiziert und unterschieden werden:

- Zellen der **ersten Zone** (direkt über dem lebenden Stratum Granulosum) besitzen das größte hygroskopische Potential, das sich in einer großen Verdickung infolge Wasseraufnahme sowie nach dem Plungegefrieren durch große Eissegregationsmuster im Inneren äußert. Mit dem Umbau der Plasmamembran zur Cornified Envelope ist eine funktionelle Permeabilitätsbarriere erst im Entstehen begriffen.
- Die **zweite Zone** zeigt insgesamt eine sehr geringe Wasseraufnahme-Kapazität. Insbesondere bei Applikation hochkonzentrierter Salzlösungen (ab 15 %) sind die einzelnen Corneozyten außergewöhnlich dünn und zeigen ein sehr kleines Segregationsmuster. Zusammen mit der Auswertung der Dickenmessungen läßt dies die Vermutung zu, daß sich bei diesen Salzkonzentrationen keine osmotische Kraft und somit kein Gradient zwischen dem Äußeren und dem Inneren der Corneozyten ausbildet. So ist es erstmals möglich geworden, die Osmolarität der Zellen dieser Zone abschätzen zu können.
- Corneozyten der **dritten Zone** sind wahrscheinlich Zellen der zweiten Zone, die durch zunehmende biochemische und mechanische Einflüsse der Hautaußenseite sowie vielfältige interne enzymatische Abbauprozesse degenerieren: Sie zeigen nämlich das gleiche Hydratationspotential in Abhängigkeit von den äußeren Salzlösungen wie für die zweite Zone diskutiert. Der Zellzusammenhalt ist aber offenbar vermindert (sichtbar durch die Ausbildung von Wasserkavitäten bevorzugt in dieser Zone) und das Hydratationspotential steigt.

Der Ort der effektiven Hydratationsbarriere des Stratum Corneums kann aufgrund dieser Ergebnisse in der mechanisch hochstabilen und schwankungsarmen zweiten Zone angenommen werden. Insbesondere gibt diese Zone den Hautlipiden die Möglichkeit, sich hier in einer geordneten Konfiguration auszubilden und so die bekannten extrazellulären Lipidlamellen zu bilden und diese auch bei wechselnder Luftfeuchtigkeit zu erhalten. Diese Erkenntnisse eröffnen nun die Möglichkeit der Beeinflussung, um entweder die Penetration durch das Stratum Corneum zu beschleunigen, umgekehrt den transepidermalen Wasserverlust zu reduzieren, oder den Wassergehalt des Stratum Corneums definiert zu beeinflussen.

Abkürzungsverzeichnis

BSE	rückgestreute Elektronen (englisch: <u>B</u> ack <u>S</u> cattered <u>E</u> lectrons)
EM	Elektronenmikroskopie
ET Detektor	Everhart Thornley Detektor
OsO ₄	Osmiumtetroxid
REM	Rasterelektronen-Mikroskop oder Rasterelektronen-Mikroskopie
RT	Raumtemperatur
SE	Sekundärelektronen
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskop oder Transmissionselektronen-Mikroskopie
UAc	Uranylacetat

A Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer Querschnitt durch Felder- und Leistenhaut	5
2.2	Aufbau des Kollagen I	6
2.3	Unterstruktur der Kollagenfibrillen	7
2.4	Zellverklammerungen im Stratum Corneum	10
2.5	Qualitativer Verlauf des differentiellen Wirkungsquerschnittes	14
2.6	Energieverteilung der von der Probe ausgehenden Elektronen	15
2.7	Aus der Probe ausgehende Elektronen	17
2.8	Konzentrischer Ringdetektor	18
2.9	Säule eines Rasterelektronenmikroskops mit MEDOL-Detektor	19
2.10	Kantenkontrast für Sekundärelektronen	20
2.11	Energieverlustspektrum der transmittierten Elektronen	22
2.12	Streuabsorptionskontrast im Transmissionselektronenmikroskop	23
2.13	Kantenkontrast für Sekundärelektronen	25
2.14	Gewachsenes hexagonales Eis	29
2.15	Phasendiagramm von Wasser	32
2.16	Gefrierbruch und Cryo-Ultramikrotomie vom Stratum Corneum	34
2.17	Sättigungsdruck von Eis in Abhängigkeit von der Temperatur	36
2.18	Pseudo Replika Technik	39
2.19	Übersicht über die Gefriersubstitution	39
2.20	Polymer-Dünnschnitte	40
3.1	Aufbau der Quellversuche	46
3.2	Größenvergleich der Hautproben	47
3.3	Übersicht über die Cryopräparation	48
3.4	Cryoschnitte an Hautproben	49
3.5	Gefrierätzung an einem Cryo-Hautschnitt	50
3.6	Vergleich verschiedener Rasterelektronenmikroskop-Detektoren	52
3.7	Übergang vom Stratum Granulosum zum Stratum Corneum	53
3.8	ZellZellübergänge im Stratum Corneum	54
3.9	Repräsentative Dickenmessung im Stratum Corneum	56
3.10	Artefakte bei der Gefriersubstitution	58
3.11	Transportkörbchen für Gefriersubstitution	59
4.1	Artefakte der plungegefrorenen Proben	63

4.2	Risse als Artefakte im Stratum Corneum	64
4.3	Gesamtmorphologie des Stratum Coreneums	65
4.4	Das Stratum Corneum im Transmissionselektronenmikroskop	66
4.5	Stratum Corneum-Intermediärfilamente im Transmissionselektronenmikroskop	67
4.6	Morphologie der Epidermis in plungegefrorenen Proben	68
4.7	Lipidexocytose in der obersten Stratum Granulosum-Schicht	69
4.8	Zelluläre Substrukturen in hochdruckgefrorenen Proben	70
4.9	Desmosomen im Transmissionselektronenmikroskop	71
4.10	Angeschnittenes Haar und Talgdrüse	73
4.11	Angeschnittene Fettzellen in der Dermis	74
4.12	Kollagen in plungegefrorenen Proben	75
4.13	Kollagen in hochdruckgefrorenen Proben	76
4.14	Oberflächenstruktur von Corneozyten	78
4.15	Querschnitt einer Hautstanze im Elektronenmikroskop	79
4.16	Wasserkavitäten im Stratum Corneum	80
4.17	Corneozytenverhakungen nach Exposition gegenüber destilliertem Wasser	81
4.18	Morphologie des Stratum Corneums nach Glycerinexposition	82
4.19	Morphologie des Stratum Corneum nach Quellung (Hauptexperiment)	82
4.20	Dickenmessungen nach Quellung (Hauptexperiment)	83
4.21	Mittelwerte der Dickenmessungen nach Quellung (Hauptexperiment)	84
4.22	Dickenmessungen nach Quellung (Kontrollexperiment)	87
4.23	Mittelwerte der Dickenmessungen nach Quellung (Kontrollexperiment)	88
4.24	Dickenveränderungen im Stratum Corneum nach Glycerinexposition	89
5.1	Dickenvariation der drei Stratum Corneum-Zonen bei Hydratisierung	98
5.2	Vergleich der Hydratationsergebnisse mit <i>In vivo</i> - Daten	104

B Tabellenverzeichnis

2.1	Sublimationsraten von Eis bei verschiedenen Temperaturen	37
3.1	Applizierte Medien in den Quellexperimenten	45
3.2	Zeitlicher Ablauf der Gefriersubstitution	57
4.1	Anzahl Dickenmessungen im Hauptexperiment	85
4.2	Anzahl Dickenmessungen im Kontrollexperiment	89
4.3	Anzahl Dickenmessungen im Glycerinexperiment	89

C Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Tobias Richter, Christiane Peuckert, Martin Sattler, Karsten Koenig, Iris Riemann, Ulrich Hintze, Klaus-Peter Wittern, Roland Wiesendanger und Roger Wepf: *"Dead but highly dynamic - the stratum corneum is divided into three hydration zones"*
Skin pharmacology and physiology (2004), im Druck.

Roger Wepf, Tobias Richter, Katja Dunckelmann, Martin Sattler, Stefan S. Biel, Ulrich Hintze und Klaus-Peter Wittern: *"Re-viewing the structure of the stratum corneum: corneocytes embrace each other and enhance the mechanical stability of the skin barrier."*
The Journal of Investigative Dermatology 121, Nr. 4, Seite 944 (2003)

Tobias Richter, Christiane Peuckert, Martin Sattler, Karsten König, Ulrich Hintze, Klaus-Peter Wittern und Roger Wepf: *"Sealing but highly dynamic – the Stratum Corneum is divided in three functional zones"*
The Journal of Investigative Dermatology 121, Nr. 4, Seite 948 (2003)

Tobias Richter; Martin Sattler; Roland Wiesendanger; Klaus-Peter Wittern und Roger Wepf: *"Frozen hydrated bloc-face investigation of tissue for Cryo SEM"*
Microscopy and Microanalysis 9 (Suppl. 3), Seiten 504-505 (2003)

Tobias Richter, Martin Sattler, Roland Wiesendanger, Klaus-Peter Wittern, and R. Wepf: *Frozen hydrated bloc-face investigation of tissue for Cryo SEM.*
Microscopy and Microanalysis 9 (Suppl. 2), Seiten 1546-1547 (2003)

Roger Wepf, Stephan Pfeiffer, Tobias Richter, Katja Dunckelmann, Stefan S. Biel, Klaus-Peter Wittern: *Cryopreparation of skin samples: A comparison between ultrathin cryosections and resin embedded sections of human skin.*
Microscopy and Microanalysis 9 (Suppl. 2), Seiten 180-181 (2003)

Roger Wepf, Tobias Richter, Katja Dunckelmann, Martin Sattler, Stefan S. Biel, Ulrich Hintze und Klaus-Peter Wittern: *"Reviewing the structure of the stratum corneum: corneocytes embrace each other."*

The Journal of Investigative Dermatology 119, Nr. 1, Seite 250 (2002)

Tobias Richter; Jens H. Müller; Udo D. Schwarz; Roger Wepf und Roland Wiesendanger: *"Investigation of the swelling of human skin cells in liquid media by tapping mode scanning force microscopy"*

Applied Physics A 72 (Suppl.), Seiten 125-128 (2001)

Konferenzbeiträge

Vorträge

Roger Wepf; Tobias Richter; Katja Dunckelmann, Holger Schlüter und Klaus-Peter Wittern: *"Visions of skin – the EM/LM ("morphomic") viewpoint of the skin barrier"*

Perspectives in Percutaneous Penetration, La Grande Motte, Frankreich (2004)

Tobias Richter; Martin Sattler; Roland Wiesendanger; Klaus-Peter Wittern und Roger Wepf: *"Frozen Hydrated Bloc-face Investigation of Tissue for Cryo SEM"*

Microscopy Conference 2003 der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, Dresden, Deutschland (2003)

Tobias Richter; Martin Sattler; Roland Wiesendanger; Klaus-Peter Wittern und Roger Wepf: *"Frozen Hydrated Bloc-face Investigation of Tissue for Cryo SEM"*

Microscopy and Microanalysis, San Antonio, Texas, USA (2003)

Roger, Wepf, Tobias Richter, Katja Dunckelmann, Martin Sattler, Stefan S. Biel, Ulrich Hintze und Klaus-Peter Wittern: *"Re-viewing the structure of the stratum corneum (II): corneocytes embrace each other and enhance the mechanical stability of the skin barrier."*

Gordon Research Conference on barrier function of mammalian skin, Bristol, USA (2003)

Roger Wepf, Tobias Richter, Stefan S. Biel, Jens P. Vietzke und Ulrich Hintze: *"Views & Visions – is there one right view? The need for multiperspective and multimodal structure research."*

Gordon Research Conference on barrier function of mammalian skin, Bristol, USA (2003)

Roger Wepf, Tobias Richter, Katja Dunckelmann, Martin Sattler, Stefan S. Biel, Ulrich Hintze und Klaus-Peter Wittern: *"Re-viewing the structure of the stratum corneum: corneocytes embrace each other and enhance the mechanical stability of the skin barrier."*

Joint Meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research (SCUR) (30th Annual Meeting), Salzburg, Österreich (2003)

Tobias Richter; Stefan S. Biel; Martin Sattler; Roland Wiesendanger; Klaus-Peter Wittern und Roger Wepf: *"Frozen hydrated bloc-face investigation of tissue for Cryo SEM"* Joint Microscopy Meeting, Lille, Frankreich (2002)

Roger Wepf, Tobias Richter, Jens H. Müller, Martin Sattler, Stefan S. Biel, Ulrich Hintze: *"Re-viewing the Structure of the stratum corneum: Corneocytes embraces each other."* Gordon Research Conference on barrier function of mammalian skin, Bristol, USA (2001)

Poster-Beiträge

Tobias Richter, Christiane Peuckert, Martin Sattler, Karsten König, Ulrich Hintze, Klaus-Peter Wittern, Roland Wiesendanger und Roger Wepf *"Sealing but highly dynamic - the Stratum Corneum is divided in three hydration zones"* Joint Meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research (SCUR) (30th Annual Meeting), Salzburg, Österreich (2003)

Tobias Richter; Jens H. Müller; Udo D. Schwarz und Roland Wiesendanger: *"Investigation of the swelling of human skin cells in liquid media by tapping mode scanning force microscopy"* NC-AFM; Hamburg, Deutschland (2000)

Tobias Richter; Jens H. Müller; Udo D. Schwarz und Roland Wiesendanger: *"Investigation of the swelling of human skin cells in different media by means of scanning force microscopy"* Spring Conference, Deutsche Physikalische Gesellschaft; Regensburg, Deutschland (2000)

Tobias Richter; Jens H. Müller; Udo D. Schwarz und Roland Wiesendanger: *"Quellverhalten von menschlichen Corneozyten in verschiedenen Medien"* 6th DI-Veeco Usermeeting; Mainz, Deutschland (2000)

D Literaturverzeichnis

- [1] ROTHMAN, S. ; SCHAAF, F.: *Chemie der Haut*. antiquarisch
- [2] KANITAKIS, J.: Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. In: *European journal of dermatology* 12 (2002), Nr. 4, S. 390–399
- [3] LANDMANN, Lucas: *Permeabilitätsbarriere der Epidermis*. Berlin : Grosse Verlag, 1985
- [4] SCHIEBLER, Theodor H. ; SCHMIDT, Walter: *Anatomie*. 8. Springer Verlag, 2002
- [5] M., Fartasch: Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. In: *Microscopy research and technique* 37 (1997), Nr. 3, S. 193–199
- [6] WARNER, Roland R. ; STONE, Keith J. ; BOISSY, Ying L.: Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure. In: *Journal for Investigative Dermatology* 120 (2003), Nr. 2, S. 275–284
- [7] BOUWSTRA, J. A. ; DE GRAAFF, A. ; GOORIS, G. S. ; NIJSSE, J. ; WIECHERS, J. W. ; VAN AELST, A. C.: Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. In: *Journal for Investigative Dermatology* 120 (2003), Nr. 5, S. 750–758
- [8] WALTHER, Paul ; MÜLLER, Martin: Biological ultrastructure as revealed by high resolution cryo-SEM of block faces after cryo-sectioning. In: *Journal of microscopy* 196 (1999), Nr. 3, S. 297–287
- [9] LEONHARDT, Helmut: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 8. Thieme Verlag, 1990
- [10] LODISH, Harvey ; BALTIMORE, David ; BERK, Arnold ; ZIPURSKY, S. L. ; MATSUDAIRA, Paul ; DARNELL, James: *Molekulare Zellbiologie*. 2. Walter de Gruyter, 1996
- [11] BALDOCK, C. ; GILPIN, C. J. ; KOSTER, A. J. ; ZIESE, U. ; KADLER, K. E. ; KIELTY, C. M. ; HOLMES, D. F.: Three-dimensional reconstructions of extracellular matrix polymers using automated electron tomography. In: *Journal of structural biology* 138 (2002), Nr. 1-2, S. 130–136

- [12] RUGGERI, A ; BENAZZO, F ; REALE, E: Collagen fibrils with straight and helicoidal microfibrils: a freeze-fracture and thin-section study. In: *Journal of ultrastructure research* 68 (1979), Nr. 1, S. 101–108
- [13] OTTANI, V. ; MARTINI, D. ; FRANCHI, M. ; RUGGERI, A. ; RASPANTI, M.: Hierarchical structures in fibrillar collagens. In: *Micron* 33 (2002), Nr. 7-8, S. 587–596
- [14] REALE, E. ; BENAZZO, F. ; RUGGERI, A.: Differences in the microfibrillar arrangement of collagen fibrils. Distribution and possible significance. In: *Journal of submicroscopic cytology* 13 (1981), Nr. 2, S. 135–143
- [15] MOLL, R. ; FRANKE, W. W. ; SCHILLER, D. L. ; GEIGER, B. ; KREPLER, R.: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. In: *Cell* 31 (1982), S. 11–24
- [16] E., Fuchs: Keratins and the skin. In: *Annual review of cell and developmental biology* 11 (1995), S. 123–153
- [17] COULOMBE, P. ; OMARY, M.: "Hard" and "soft" principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. In: *Current opinion in cell biology* 14 (2002), S. 110–122
- [18] MONTAGNA, William ; KLIGMAN, Albert M. ; CARLISLE, Kay S.: *Atlas of normal human skin*. Springer Verlag, 1992
- [19] BRIGGAMAN, R. A. ; WHEELER, C. E.: The epidermal-dermal junction. In: *Journal for Investigative Dermatology* 65 (1975), Nr. 1, S. 71–84
- [20] Kap. 24 In: RUBIN, E.: *Pathology*. J. L. Faber, 1994, S. 1177–1183
- [21] WARNER, R. R. ; MYERS, M. C. ; TAYLOR, D. A.: Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. In: *Journal for Investigative Dermatology* 90 (1988), Nr. 2, S. 218–224
- [22] HARA, M. ; MA, T. ; VERKMAN, A. S.: Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3 deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity and barrier recovery. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (2002), Nr. 48, S. 46616–46621
- [23] CASPERS, P. J. ; LUCASSEN, G. W. ; WOLTHUIS, R ; BRUINING, H. A. ; PUPPELS, G. J.: In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. In: *Biospectroscopy* 4 (1998), S. 31–39
- [24] CASPERS, Peter J. ; LUCASSEN, Gerald W. ; CARTER, Elizabeth A. ; BRUINING, Hajo A. ; PUPPELS, Gerwin J.: In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. In: *Journal for Investigative Dermatology* 116 (2001), Nr. 3, S. 434–442

-
- [25] NORTH, Alison J. ; BARDSLEY, William G. ; HYAM, Janine ; BORNSLAEGER, Ely-
ne A. ; CORDINGLEY, Hayley C. ; TRINNAMAN, Brian ; HATZFELD, Mechthild ;
GREEN, Kathleen J. ; MAGEE, Anthony I. ; GARROD, David R.: Molecular map of
the desmosomal plaque. In: *Journal of cell science* 112 (1999), Nr. 23, S. 4325–4336
- [26] UDE, Joachim ; KOCH, Michael: *Die Zelle*. 2. Gustav Fischer Verlag, 1994
- [27] JARNIK, M. ; SIMON, M. N. ; STEVEN, A. C.: Cornified cell envelope assembly: a model
based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. In:
Journal of cell science 111 (1998), Nr. 8, S. 1051–1060
- [28] ISHIDA-YAMAMOTO, A. ; IIZUKA, H.: Structural organization of cornified cell envelopes
and alterations in inherited skin disorders. In: *Experimental dermatology* 7 (1998), S.
1–10
- [29] ELIAS, P. M.: Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. In: *The Journal
of investigative dermatology* 80 (1983), S. 44s–49s
- [30] ELIAS, P. M. ; MENON, G. K.: Structural and lipid biochemical correlates of the
epidermal permeability barrier. In: *Advances in lipid research* 24 (1991), S. 1–26
- [31] SCHURER, N. Y. ; PLEWIG, G. ; ELIAS, P. M.: Stratum corneum lipid function. In:
Dermatologica 183 (1991), Nr. 2, S. 77–94
- [32] ELIAS, P. M. ; FEINGOLD, K. R.: Lipid-related barriers and gradients in the epidermis.
In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 548 (1988), S. 4–13
- [33] NORLEN, L. ; AL-AMOUDI, A. ; DUBOCHET, J.: A cryotransmission electron micros-
copy study of skin barrier formation. In: *The Journal of investigative dermatology* 120
(2003), Nr. 4, S. 555–560
- [34] HUH, C. H. ; SEO, K. I. ; KIM, S. D. ; HAN, J. H. ; EUN, H. C.: Biophysical changes
after mechanical injury of the stratum corneum in normal skin. In: *Contact Dermatitis*
46 (2002), Nr. 1, S. 24–28
- [35] TSAI, J. C. ; SHEU, H.M. ; HUNG, P. L. ; CHENG, C. L.: Effect of barrier disruption
by acetone treatment on the permeability of compounds with various lipophilicities:
implications for the permeability of compromised skin. In: *Journal of pharmaceutical
sciences* 90 (2001), Nr. 9, S. 1242–1254
- [36] TAGAMI, H. ; KOBAYASHI, H. ; ZHEN, X. S. ; KIKUCHI, K.: Environmental effects
on the functions of the stratum corneum. In: FOR DERMATOLOGICAL RESEARCH,
European S. (Hrsg.): *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings
/ the Society for Investigative Dermatology, Inc.* Bd. 6, 2001, S. 87–94

- [37] BLACK, D. ; DEL POZO, A. ; LAGARDE, J. M. ; GALL, Y.: Seasonal variability in the biophysical properties of stratum corneum from different anatomical sites. In: *Skin research and Technology* 6 (2000), S. 70–76
- [38] YA-XIAN, Z. ; SUETAKE, T. ; TAGAMI, H.: Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. In: *Archives of dermatological research* 291 (1999), S. 555–559
- [39] GERHARDI, S. *Die Charakterisierung von Kohlehydraten der menschlichen Hornschicht mittels Lectinen*. Diplomarbeit, Fachhochschule Hamburg. 1983
- [40] PLEWIG, G. ; JANSEN, T. ; SCHÜRER, N. Y.: Das Stratum Corneum. In: *Der Hautarzt* 48 (1997), S. 510–521
- [41] MARKS, R.: *Stratum Corneum*. Springer Verlag, 1983
- [42] VISSCHER, M. O. ; TOLIA, G. T. ; WICKETT, R. R. ; HOATH, S. B.: Effect of soaking and natural moisturizing factor on stratum corneum water-handling properties. In: *Journal of cosmetic science* 54 (2003), Nr. 3, S. 289–300
- [43] REIMER, Ludwig ; PFEFFERKORN, Gerhard: *Rasterelektronenmikroskopie*. 1. Springer Verlag, 1977
- [44] REIMER, Ludwig: *Transmission Electron Microscopy*. 4. Springer Verlag, 1997
- [45] EGERTON, R. F.: Measurement of inelastic/elastic scattering ratio for fast electrons and its use in the study of radiation damage. In: *Phys. Status Solidi A* 37 (1976), S. 663ff
- [46] REIMER, L. ; ROSS-MESSEMER, M.: Contrast in the electron spectroscopic imaging mode of a TEM. II. Z-ratio, structure-sensitive and phase contrast. In: *Journal of Microscopy* 159 (1990), S. 143ff
- [47] SCHMIDT, Peter F. ; BALK, L. J. ; BLASCHKE, R. ; BRÖCKER, W. ; DEMM, E. ; ENGEL, L. ; GÖCKE, R. ; HANTSCH, H. ; HAUERT, R. ; KREFTING, E. R. ; MÜLLER, Th. ; RAITH, H. ; ROTH, M. ; WOODTLI, J.: *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*. 1. expert-Verlag, 1994. – ISBN 3-8169-1038-6
- [48] ZACH, Joachim: *Entwurf und Berechnung eines hochauflösenden Niederspannungs-Rasterelektronenmikroskops*, Fachbereich Physik der Technischen Hochschule Darmstadt, Dissertation, 1989
- [49] ZACH, Joachim ; HAIDER, Maximilian: Correction of spherical and chromatic aberration in a low voltage SEM. In: *Optik* 98 (1995), Nr. 3, S. 112–118

-
- [50] O'TOOLE, E. T. ; WINEY, M. ; MCINTOSH, J. R.: High-voltage electron tomography of spindle pole bodies and early mitotic spindles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular biology of the cell* 10 (1999), Nr. 6, S. 2017–2031
- [51] PLATTNER, Helmut ; ZINGSHEIM, Horst-Peter: *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. 1. Gustav Fischer Verlag, 1987
- [52] REIMER, Ludwig: *Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden*. 1. Springer Verlag, 1959
- [53] ECHLIN, Patrick: *Low-Temperature Microscopy and Analysis*. 1. Plenum Press, 1992
- [54] BOZZOLA, John J. ; RUSSELL, Lonnie D.: *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. 2. Jones and Bartlett Publishers, 2002
- [55] MÜLLER, Martin: The integrating power of cryofixation-based electron microscopy in biology. In: *Acta Microscopica* 1 (1992), S. 37–44
- [56] WILSON, M. T. ; FARMER, M. A. ; KARWOSKI, C. J.: Ultrastructure of frog retina after high-pressure freezing and freeze substitution. In: *Journal of Microscopy* 189 (1998), Nr. 3, S. 219–235
- [57] MURK, J. L. A. N. ; POSTHUMA, G. ; KOSTER, A. J. ; GEUZE, H. J. ; VERKLEIJ, A. J. ; KLEIJMEER, M. J. ; HUMBEL, B. M.: Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography. In: *Journal of Microscopy* 212 (2003), Nr. 1, S. 81–90
- [58] MAUNSBACH, A. B.: The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. II. Effects of varying osmolality, ionic strength, buffer system and fixative concentration of glutaraldehyde solutions. In: *Journal of ultrastructure Research* 15 (1966), S. 283–309
- [59] TOKUYASU, K. T.: A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. In: *Journal of Cell Biology* 57 (1973), S. 551–565
- [60] TOKUYASU, K. T.: Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. In: *Journal of Microscopy* 143 (1986), Nr. 2, S. 139–149
- [61] GRIFFITHS, Gareth: *Fine Structure Immunocytochemistry*. 1. Springer Verlag, 1993
- [62] LEE, Richard E. ; WARREN, Gareth J. ; GUSTA, Lawrence V.: *Biological Ice Nucleation and its Applications*. 1. APS Press St. Paul, USA, 1995
- [63] KANNO, H. ; SPEEDY, R. J. ; ANGELL, C. A.: Supercooling of water to -92°C under pressure. In: *Science* 189 (1975), S. 880–881

- [64] CAMERON, I. L. ; KANAL, K. M. ; KEENER, C. R. ; FULLERTON, G. D.: A mechanistic view of the non-ideal osmotic and motional behavior of intracellular water. In: *Cell Biology International* 21 (1997), Nr. 2, S. 99–113
- [65] MOOR, H. ; RIEHLE, U.: Snap-freezing under high pressure: a new fixation technique for freeze etching. In: BOCCIARELLI, S. (Hrsg.): *Proc 4th Eur. Reg. Conf. Electron Microsc., Rome*. Bd. 2, 1968, S. 445–446
- [66] BAL-TEC. *Foehrenweg 16, FL-9496 Balzers, Liechtenstein*
<http://www.bal-tec.com> ; sales@bal-tec.com
- [67] HOHENBERG, H. ; TOBLER, M. ; MÜLLER, M.: High-pressure freezing of tissue obtained by fine-needle biopsy. In: *Journal of Microscopy* 183 (1996), Nr. I, S. 133–139
- [68] STUDER, D. ; MICHEL, M. ; WOHLWEND, M. ; HUNZIKER, E. B.: Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing. In: *Journal of Microscopy* 179 (1995), S. 321–332
- [69] PFEIFFER, Stephan ; VIELHABER, Gabriele ; VIETZKE, Jens-Peter ; WITTERN, Klaus-Peter ; HINTZE, Ulrich ; WEPF, Roger: High-Pressure Freezing provides new information on human Epidermis: Simultaneous Protein Antigen and Lamellar Lipid Structure Preservation. Study on human Epidermis by Cryoimmobilization. In: *Journal for Investigative Dermatology* 114 (2000), S. 1030–1038
- [70] WEPF, Roger A.: *Surface imaging of protein complexes with high resolution coating, TEM, SEM and STM techniques*, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Dissertation, 1992
- [71] UMRATH, Walter: Berechnung von Gefriertrocknungszeiten für die elektronenmikroskopische Präparation. In: *Mikroskopie* 40 (1983), S. 9–34
- [72] NIETSCH, W. ; JOCHEM, E.: Gerüst- und Grenzflächenwiderstand bei der Gefriertrocknung dünner Schichten. In: *Vakuum-Technik* 22 (1973), S. 73–85
- [73] STUMPF, W. E. ; ROTH, L. J.: Freeze-drying of small tissue samples and thin frozen sections below -60°C . In: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 15 (1967), S. 243–251
- [74] STEPHENSON, J. L.: Theory of the vacuum drying of frozen tissues. In: *Bull. Math. Biophys.* 15 (1953), S. 411–429
- [75] BISHOP, W. R.: Methodology of rapid deep freeze cleavage replication of mammalian tissues and cells. / Balzers high vacuum report 24. 1969. – Forschungsbericht
- [76] WALTHER, P. ; WEHRLI, E. ; HERMANN, R. ; MÜLLER, M.: Double-layer coating for high-resolution low-temperature scanning electron microscopy. In: *Journal of Microscopy* 179 (1995), S. 229–237

-
- [77] HUMBEL, B. M.: *Gefriersubstitution – Ein Weg zur Verbesserung der morphologischen und zytochemischen Untersuchung biologischer Proben im Elektronenmikroskop*, ETH Zürich, Dissertation, 1984
- [78] HESS, M. W.: Of plants and other pets: practical aspects of freeze-substitution and resin embedding. In: *Journal of Microscopy* 212 (2003), S. 44–52
- [79] REYNOLDS, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. In: *The Journal of cell biology*. 17 (1963), S. 208–212
- [80] RAWLINGS, A. V.: Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. In: *International Journal of Cosmetic Science* 25 (2003), S. 63–95
- [81] RITTER, Martin ; HENRY, Didier ; WIESNER, Stefan ; PFEIFFER, Stephan ; WEPF, Roger: A Versatile High-Vacuum Cryo-Transfer for Cryo-FESEM, Cryo-SPM and other Imaging Techniques. In: *Microscopy and Microanalysis* Bd. 5, 1999, S. 424–425
- [82] LEO ELEKTRONEN MIKROSKOPIE. *Oberkochen, Deutschland*
<http://www.leo.de> ; sales-de@leo-em.com
- [83] WALTHER, Paul ; AUTRATA, Rudolf ; CHEN, Ya ; PAWLEY, James B.: Backscattered electron imaging for high resolution surface scanning electron microscopy with a new type YAG-detector. In: *Scanning Microscopy* 5 (1991), Nr. 2, S. 301–310
- [84] LEICA MIKROSYSTEME. *Lilienthalstrasse 39-45, D-64625 Bensheim, Deutschland*
<http://www.em-preparation.com>
- [85] FEI COMPANY. *Bruckmannring 40, D-85764 Oberschleissheim, Deutschland*
www.feicompany.com ; munich@feilabservices.com
- [86] WEAST, Robert C. (Hrsg.): *Handbook of Chemistry and Physics*. 56. CRC Press, 1976
- [87] CASPERS, P. J. ; LUCASSEN, G. W. ; BRUINING, H. A. ; PUPPELS, G. J.: Automated depth-scanning confocal raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin. In: *Journal of Raman Spectroscopy* 31 (2000), S. 813–818
- [88] AEBI, U. ; HAENER, M. ; TRONCOSO, J. ; EICHNER, R. ; ENGEL, A.: Unifying Principles in Intermediate Filament (IF) Structure and Assembly. In: *Protoplasma* 145 (1988), S. 73–81
- [89] JONCA, N. ; GUERRIN, M. ; HADJIOLOVA, K. ; CAUBET, C. ; GALLINARO, H. ; SIMON, M. ; SERRE, G.: Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (2002), S. 5024–5029

- [90] HARDING, C. R. ; WATKINSON, A. ; RAWLINGS, A. V. ; SCOTT, I. R.: Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. In: *International Journal of Cosmetic Science* 22 (2000), S. 21–52
- [91] MOOR, Hans: Cryotechnology for the structural analysis of biological material. In: SOCIETE FRANCAISE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (Hrsg.): *Freeze-Etching: Techniques and applications*, 1973, S. 11–20
- [92] MANTOVANI, R. ; RORA, A. ; FALOMO, M. E. ; BAILONI, L. ; VINCENTI, L.: Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. In: *Reproduction, nutrition, development* 42 (2002), Nr. 3, S. 217–226
- [93] PEUCKERT, Christiane. *Anwendung von Femtosekunden-Laserpulsen im NIR-Spektralbereich für Untersuchungen an humaner Haut*. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller Universität, Jena. 2001
- [94] PSCHYREMBEL, Willibald: *Klinisches Wörterbuch*. 257. de Gruyter, 1994
- [95] NICOLOPOULOS, Christos S. ; GIANNOUDIS, Panagiotis V. ; GLAROS, Kostas D. ; BARBENEL, Joe C.: In vitro study of the failure of skin surface after influence of hydration and preconditioning. In: *Archives of dermatological research* 290 (1998), S. 638–640
- [96] PSORIASIS-NETZ. <http://www.psoriasis-netz.de>
- [97] TAN, M. H. ; LEBWOHL, M.: Psoriasis. In: *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)* 34 (1998), Nr. 7, S. 641–647
- [98] BOS, J. D. ; MEINARDI, M. M.: The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. In: *Experimental dermatology* 9 (2000), S. 165–169

Danksagung

Wissenschaft ist immer das Spiel eines Teams, sodaß auch diese Arbeit ohne hilfreiche Unterstützung so niemals möglich gewesen wäre. Hervorheben möchte ich dabei insbesondere folgende Personen(gruppen):

ROGER WEPF,

als meinen direkten Betreuer, der mir in allen fachlichen wie auch menschlichen Schwierigkeiten zuverlässig zur Seite stand. In seinem Forscherdrang und Wissensdurst fand ich eine nie versiegende Quelle der Inspiration.

ROLAND WIESENDANGER

als Kopf der Arbeitsgruppe "Rastersondenmethoden" gilt mein Dank, weil er mir die Möglichkeit gab, die Untersuchung der menschlichen Haut im Rahmen meiner Diplomarbeit auch anschließend in dieser Doktorarbeit weiterzuführen.

KLAUS-PETER WITTERN

als Leiter der Forschungs- und Entwicklungsabteilung bei Beiersdorf in seiner Funktion als mein oberster Chef für die Begutachtung dieser Dissertation und seine Unterstützung bei den Planungen für die Zeit nach dieser Arbeit.

ULRICH HINTZE

für sein lebhaftes Interesse an meiner Arbeit und die Gespräche "neben" der Arbeit, in denen ich ihn als vielseitig gebildeten Menschen kennengelernt habe.

HORST WENCK,

weil ich durch seine fordernde und bestimmte, aber gleichzeitig freundliche und offene Art stets motiviert war, mein Bestes zu geben.

MEINE ELTERN

gaben mir in manch schwierigen Situationen stets Unterstützung, sowohl mental wie auch ganz praktisch. Ohne sie wäre diese Arbeit so niemals möglich gewesen.

STEFAN BIEL danke ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen, die mich an seiner reichlichen fachlichen wie menschlichen Lebenserfahrung teilhaben lassen durften.

MARTIN SATTLER für seine Geräteführungen an der Gefrierätzanlage und dem Rasterelektronenmikroskop sowie in die vielen begleitenden Diskussionen.

SONJA WESSEL für den gedanklichen Austausch über alle Laborinterna beim gemeinsamen allmorgentlichen 7:00 Kaffee.

Allen anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppen bei Beiersdorf und der Universität, die alltäglich meine Ecken, Kanten und Eigenheiten ertragen mußten 😊