

**Quantitative Untersuchungen der  
Dentin–Mineralisierung von Ratten–Incisoren  
mittels energie–dispersiver  
Elektronenbeugung**

**Siegfried Arnold**

**Diplomarbeit im Fach Physik  
Physikalisches Institut der  
Westfälischen Wilhelms–Universität Münster  
März 1994**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Energiefilterndes Transmissionselektronenmikroskop</b>	<b>2</b>
2.1	Das Transmissionselektronenmikroskop . . . . .	2
2.2	Das Castaing–Henry–Energiefilter . . . . .	3
2.3	Betriebsmoden eines EFTEM . . . . .	4
2.3.1	Elektronenspektroskopischer Beugungs–Modus . . . . .	5
2.3.2	Line-scan Diagramme von ESD–Bildern . . . . .	6
2.3.3	Elektronenspektroskopischer Abbildungs–Modus . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Theorie der Streuprozesse</b>	<b>8</b>
3.1	Elastische Streuung . . . . .	8
3.2	Unelastische Streuung . . . . .	12
3.3	Beugungstheorie . . . . .	15
3.3.1	Struktur– und Gitteramplitude . . . . .	16
3.3.2	Bragg–Bedingung . . . . .	17
3.3.3	Intensität der Debye–Scherrer–Ringe . . . . .	18
<b>4</b>	<b>Präparation</b>	<b>20</b>
4.1	Material und Methoden . . . . .	20
4.2	Ultradünnschnitte eingebetteter Ratten–Incisoren . . . . .	21
4.3	Schnittickenbestimmung . . . . .	23
4.3.1	Interferenzfarben–Methode . . . . .	23
4.3.2	Transmissionsmessung . . . . .	24

<b>5</b>	<b>Dentinbildung von Ratten-Incisoren</b>	<b>28</b>
5.1	Ausbildung der Dentinmatrix . . . . .	28
5.2	Aufbau der Kristallite . . . . .	30
5.3	Allgemeine Dentinogenese . . . . .	32
5.4	Reifung der Dentinkristallite . . . . .	34
5.4.1	Primäres Kristallitwachstum . . . . .	35
5.4.2	Wachstumslinien . . . . .	38
5.5	Strahlenschädigung . . . . .	45
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>49</b>

# 1 Einleitung

Das dentale Hartgewebe Zahnbein (Dentin) ist in seiner chemischen Zusammensetzung sehr ähnlich dem Knochen und anderen biologischen Hartgeweben wie dem Zement. Es wird wie alle Hartgewebe durch das Mineral Apatit gebildet. Die Dentin-Mineralisierung kann daher als generelles Prinzip der Ausbildung kollagenreicher Hartgewebe angesehen werden.

In dieser Arbeit wird das Hartgewebe Dentin von Ratten-Incisoren mit einem energiefilternden Transmissionselektronenmikroskop (EFTEM) untersucht. Die strukturellen Untersuchungen werden im elektronenspektroskopischen Beugungs-Modus (ESD) mit einer Ausfilterung der unelastischen Elektronen durchgeführt. Durch diese zero-loss Filterung kann der durch die unelastischen Elektronen verrauschte Untergrund unterdrückt werden, wodurch der Kontrast gesteigert wird. Es können charakteristische Debye-Scherrer-Beugungsringe des dentalen Hartgewebes sichtbar gemacht werden, die ohne zero-loss Filterung, wie in einem konventionellen Transmissionselektronenmikroskop (CTEM), auf Grund ihrer schwachen Intensität nicht mehr erkennbar sind. Die morphologischen Untersuchungen werden im elektronenspektroskopischen Abbildungs-Modus (ESI) durchgeführt. Auch hierbei wird die zero-loss Filterung angewandt und so im Vergleich mit einem CTEM ein vielfach verbesserter Bildkontrast erreicht.

Bei der Untersuchung der Dentinbildung wird versucht, die Kristallitreifung des Dentins mittels zero-loss gefilterter ESD strukturell zu analysieren. Hierzu wird zum einen die Mineralisation von der Kristallit-Keimbildung an polare Gruppen, den sogenannten „aktiven Zentren“, der betreffenden Proteine bis zur Ausbildung ausmineralisierter Kristallite betrachtet. Zum anderen wird der Verlauf der Mineralisation strukturell genauer untersucht, da es sich bei der dentalen Hartgewebsbildung um einen rhythmischen Vorgang handelt.

## 2 Energiefilterndes TEM

### 2.1 Das Transmissionselektronenmikroskop

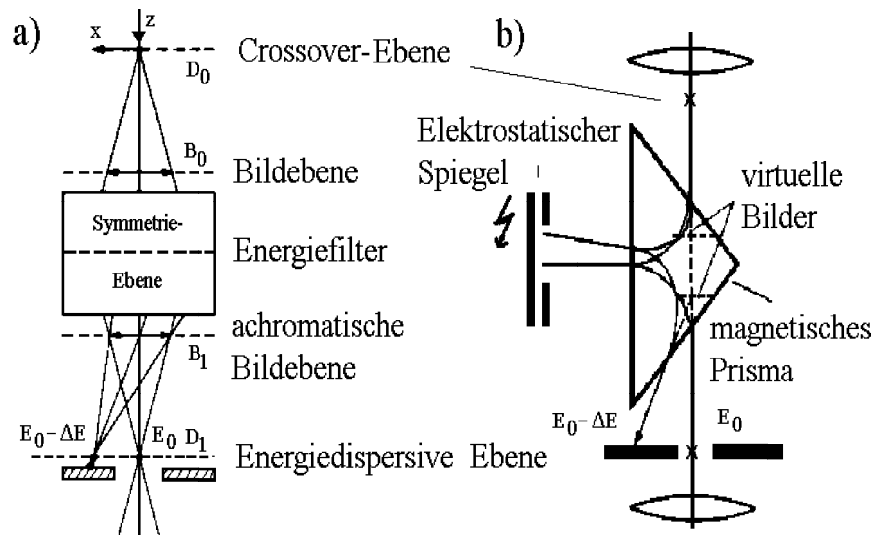
In einem konventionellen Transmissionselektronenmikroskop (CTEM) können zur Untersuchung von Präparaten die Abbildung (Image-Mode) und die Elektronenbeugung (Diffraction-Mode) benutzt werden. Durch elastische und unelastische Streuprozesse treten bei den Primärelektronen beim Durchlaufen des Präparates Energieverluste und Ablenkungen um den Streuwinkel  $\theta$  auf. Bei der elastischen Streuung (Kap. 3.1) werden die Elektronen durch die Coulombkraft des Atomkerns abgelenkt und erfahren in den für die Transmissions-Elektronenmikroskopie interessierenden Streuwinkeln keine meßbaren Energieverluste. Die unelastische Streuung (Kap. 3.2) resultiert aus Wechselwirkungen des Primärelektrons mit Hüllenelektronen. Dieses führt zu einer Anregung eines Hüllenelektrons des Atoms und einem Energieverlust  $\Delta E$  des Strahlelektrons. Der Farbfehler (chromatische Aberration) der Elektronenlinse führt dazu, daß Elektronen mit einem Energieverlust  $\Delta E$  eine kürzere Brennweite als ungestreute Elektronen aufweisen. Mit Hilfe eines Energiefilters im Strahlengang des Mikroskops kann dieser störende Untergrund durch Ausfilterung der unelastisch gestreuten Elektronen reduziert werden. Es besteht ferner mit diesem Filter die Möglichkeit einer energieselektiven Elektronenbeugung und/oder Abbildung. Mit Hilfe dieser Energieselektion können auch Elektronen-Energie-Verlustspektren (EELS) aufgenommen werden, um weitere Informationen über das Präparat zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde das erste kommerziell erhältliche Elektronenmikroskop mit einem integrierten Energiefilter, das EM 902 der Firma Zeiss, verwendet. Bei diesem Mikroskop ist ein von Ottensmeyer weiterentwickeltes Castaing-Henry-Energiefilter [6] zwischen dem ersten und zweiten Projektiv-

linsensystem in die Mikroskop-Säule integriert (Abb. 2.2). Bei den Untersuchungen zur Dentinmineralisierung wurde die Beschleunigungsspannung von  $U = 80 \text{ kV}$  verwendet.

## 2.2 Das Castaing–Henry–Energiefilter

Das Energiefilter im EM 902 besteht aus einem Prisma, in dem zwischen magnetischen Weicheisenplatten ein homogenes Magnetfeld senkrecht zum Elektronenstrahl erzeugt wird (Abb. 2.1b). Die Strahlelektronen werden in der oberen Hälfte des magnetischen Prismas um  $90^\circ$  abgelenkt und anschließend an dem elektrostatischen Spiegel reflektiert. Da es sich bei dem Spiegel um eine Gegenfeldelektrode handelt, muß an dem Spiegel ein negatives Potential als an der Kathode angelegt sein. Dieses bedingt eine Beschränkung der Beschleunigungsspannung auf  $80 \text{ kV}$ , da es bei höheren Spannungen zu Überschlügen kommen kann. Auf Grund des symmetrischen Prismas werden die Elektronen nach der Reflektion mittels einer  $90^\circ$ -Ablenkung wieder auf die optische Achse des Mikroskops gebracht (Abb. 2.1).



**Abbildung 2.1:** Schematischer Strahlengang in dem Castaing–Henry–Energiefilter

Durch die Lorenzkraft werden Elektronen mit unterschiedlichen Energien in dem magnetischen Prisma verschieden abgelenkt. Das Prisma ist so abgestimmt, daß die virtuellen Ebenen des Filters, die Filtereintrittsebene ( $B_0$ ) und die Filteraustrittsebene ( $B_1$ ), zueinander konjugiert sind

und unvergrößert aufeinander abgebildet werden (Abb. 2.1a). Durch die verschiedenen Ablenkungswinkel in dem magnetischen Prisma besitzen die Elektronen in der Filteraustrittsebene zusätzlich energieabhängige Austrittswinkel. Aus diesem Grund wird die Filteraustrittsebene auch als achromatische Bildebene bezeichnet. Die hintere Fokalebene des ersten Projektivlinsensystems ( $D_0$ ), die Crossover-Ebene, ist konjugiert zu der energiedispersiven Ebene ( $D_1$ ). In dieser Ebene  $D_1$  entstehen je nach Energieverlust der Elektronen getrennte Abbildungen der Crossover-Ebene durch die energieabhängigen Austrittswinkel der achromatischen Bildebene (Abb. 2.1, Abb. 2.2).

Durch eine Spaltblende in der energiedispersiven Ebene können Energieverlust-Bereiche ausgewählt werden, die auf der Endbildebene abgebildet werden sollen (Abb. 2.2). Die Breite des Spaltes legt die Größe des ausgewählten Energiefensters bzw. die Energieauflösung  $\delta E$  fest, wobei die maximale Energieauflösung entscheidend durch die Elektronenemission an der Kathode und des Öffnungsfehlers zweiter Ordnung des Filters festgelegt wird. Die maximale Energieauflösung  $\delta E$  in dem EM 902 beträgt etwa 1 bis 2 eV. Die Breite des Energiefensters muß aber auch so gewählt werden, daß eine zur Registrierung ausreichende Intensität vorliegt.

## 2.3 Betriebsmoden eines EFTEM

Bei biologischen Proben werden in Abhängigkeit von den Parametern der Präparate unterschiedliche Betriebsmoden in dem EM 902 gewählt [55]. In dieser Arbeit wurde der elektronenspektroskopische Abbildungs-Modus (ESI = Electron Spectroscopic Imaging) und der elektronenspektroskopische Beugungs-Modus (ESD = Electron Spectroscopic Diffraction) mit einer zero-loss Filterung zur Verbesserung der Bildkontraste verwendet. Aus diesem Grund werden nur der ESI- und der ESD-Modus behandelt. Ausführliche Beschreibungen zu allen Betriebsmoden des EFTEM sind bei Reimer [55, 56] und Rennekamp [58] zu finden.

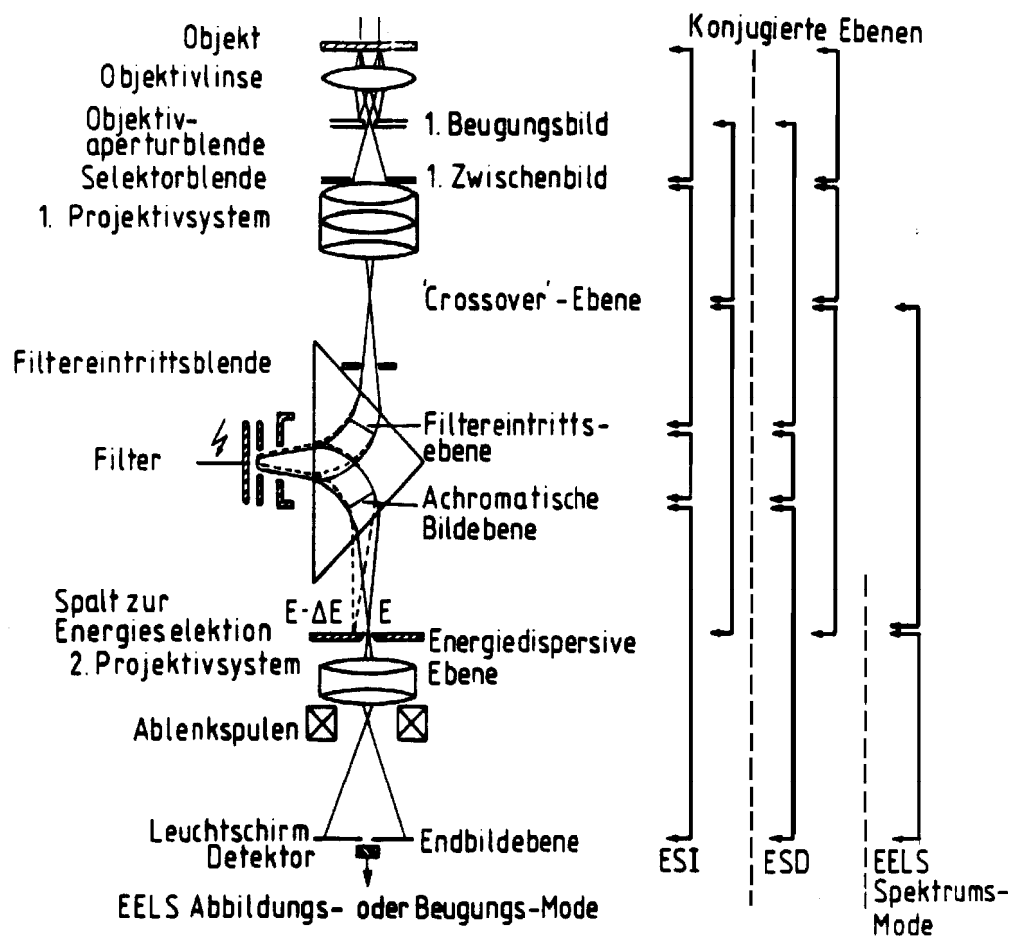


Abbildung 2.2: Schematischer Strahlengang des EM 902 mit unterschiedlichen Abbildungs-Moden und den zueinander konjugierten Ebenen.

### 2.3.1 Elektronenspektroskopischer Beugungs-Modus

In der hinteren Brennebene der Objektivlinse befindet sich das erste Beugungsbild des Präparates (Abb. 2.2). In dem Beugungs-Modus (ESD) wird dieses erste Beugungsbild durch das erste Projektivlinsensystem auf die Filtereintrittsebene vergrößert abgebildet. Mit einer Selektorblende in der Ebene des ersten Zwischenbildes kann bei der Feinbereichsbeugung (SAED = Selected Area Electron Diffraction) ein Objektbereich des Präparates ausgewählt werden, der auf die Filtereintrittsebene abgebildet werden soll. Die Filtereintrittsebene wird anschließend im Verhältnis 1:1 auf die achromatische Bildebene übertragen. Das zweite Projektivlinsensystem bildet dann das Bild der achromatischen Bildebene auf die Endbildebene ab (Abb. 2.2). In der energiedispersiven Ebene können bei der zero-loss



Filterung mit Hilfe einer Spaltblende die ungestreuten und die in kleine Winkel elastisch gestreuten Elektronen mit ( $\Delta E = 0$  eV) durchgelassen werden (Abb. 2.1b). Hierdurch wird der durch die unelastisch gestreuten Elektronen hervorgerufene Untergrund unterdrückt und der Kontrast der Bragg–Reflexe erhöht.

### 2.3.2 Line-scan Diagramme von ESD–Bildern

Bei der ESD–Untersuchung polykristalliner Präparate treten die rotations-symmetrischen Debye–Scherrer–Ringe auf (Kap. 3.3). Aus diesem Grund können diese zweidimensionalen Beugungsbilder durch eindimensionale Darstellungen, den line-scan Diagrammen, vollständig beschrieben werden. Die unterschiedlichen Intensitäten der Debye–Scherrer–Ringe werden dabei in Abhängigkeit der jeweiligen Bragg–Winkel  $\theta_B$  bzw. der Streuwinkel  $\theta = 2\theta_B$  dargestellt. Hierzu wurde eine Ablenkeinheit unter dem zweiten Projektivlinsensystem benutzt, die den Elektronenstrahl in zwei senkrecht zueinander liegende Richtungen ablenken kann. Dieses wird durch Anlegen einer Spannung, entweder durch eine externe Spannungsversorgung oder durch einen Computer, ausgestattet mit einem Analog–Digital/Digital–Analog–Wandler, erreicht. Der Computer ermöglicht es, das Beugungsbild schrittweise über den Detektor, eine ZnS–Szintillator–Photomultiplier–Kombination, zu rasteren und die Intensität bezüglich des Ablenkungswinkels  $\theta$  aufzunehmen.

Die Raster–Geschwindigkeit kann variabel gestaltet werden, allerdings darf die Zeitkonstante des Photomultipliers nicht unterschritten werden, weil sonst Verfälschungen des Signals auftreten können [26]. Bei dieser Arbeit wurde die Raster–Geschwindigkeit für alle line-scan Aufnahmen konstant gewählt. Zur besseren Winkelauflösung der Debye–Scherrer–Ringe wurde eine kleine Schlitzblende von etwa 0,5 mm x 5 mm verwendet.

### 2.3.3 Elektronenspektroskopischer Abbildungs–Modus

Bei dem Abbildungs–Modus (ESI) wird durch eine gegenüber dem ESD–Modus geänderte Fokussierung des ersten Projektivlinsensystems das erste Zwischenbild auf die Filtereintrittsebene projiziert. Dieses wird dann im Verhältnis 1:1 auf die achromatische Bildebene übertragen (Abb. 2.2). Durch

Einfahren einer Objektivanaperturblende (Kontrastblende) in der Ebene des ersten Beugungsbildes wird in einem TEM eine Kontrastverbesserung erreicht, indem in größere Winkel gestreute Elektronen ausgeblendet werden. In dem EM 902 können zusätzlich die unelastisch gestreuten Elektronen ausgefiltert werden (Abb. 2.1, Abb. 2.2). Durch diese zero-loss Filterung wird eine weitere Kontraststeigerung erreicht. Anschließend wird das gefilterte Bild durch das zweite Projektivlinsensystem auf die Endbildebene projiziert.

## 3 Theorie der Streuprozesse

Ein Beugungsdiagramm kann in drei Bereiche eingeteilt werden, wobei jeder Bereich durch einen anderen Streumechanismus der Primärelektronen erzeugt wird. Diese Bereiche sind

1. der Primärstrahl; in ihm liegen alle ungestreuten Elektronen,
2. die Beugungsreflexe; sie entstehen durch konstruktive Interferenzen der elastischen Streuung,
3. der Untergrund; er entsteht fast ausschließlich aus unelastischen Streuprozessen (Plasmonenanregung, Anregung innerer Hüllenelektronen des Atoms und aus der thermisch-diffusen Streuung (TDS)) (Kap. 3.2).

Die Streuwahrscheinlichkeit der Elektronen kann mit dem Streuquerschnitt  $\sigma$  oder mit der freien Weglänge  $\Lambda$

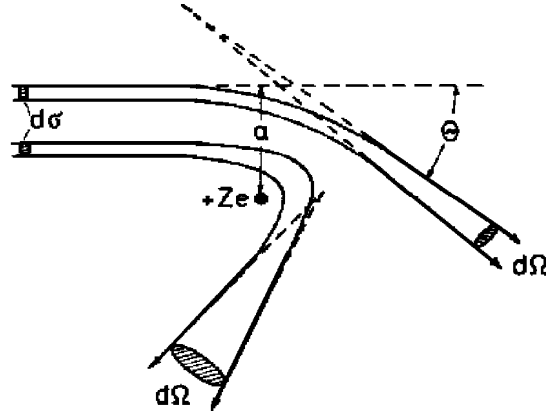
$$\Lambda = \frac{1}{N\sigma} \quad \text{mit} \quad N = \rho \frac{N_A}{A} = \frac{\text{Anzahl der Elektronen}}{\text{Volumen}}, \quad (3.1)$$

wobei  $N_A$  die Avogadro-Konstante,  $A$  das Atomgewicht und  $\rho$  die Dichte bedeuten, ausgedrückt werden. Die mittlere freie Weglänge  $\Lambda$  bezeichnet die durchschnittliche Strecke eines Primärelektrons in der Probe bis zum nächsten Streuprozess. Bei ultradünnen Präparaten mit Schichtdicken  $t \leq \Lambda$  kann im TEM näherungsweise von einer Einfachstreuung, bei Schichtdicken  $t > \Lambda$  von Mehrfachstreuung ausgegangen werden.

### 3.1 Elastische Streuung

Bei der elastischen Streuung liegt eine Wechselwirkung zwischen Primärelektron und Atomkern vor. Bei dieser Streuung gilt die Erhaltung der Summe der kinetischen Energien und die Impulserhaltung.

Zur Beschreibung der Streuung wird ein Elektron betrachtet, welches innerhalb einer Fläche  $d\sigma$  mit einem Streuparameter  $a$  am Kern vorbeifliegt



**Abbildung 3.1:** Klassische Beschreibung der elastischen Streuung und Bedeutung des differentiellen Streuquerschnittes  $d\sigma/d\Omega$ .

würde. Dieses Elektron wird an einem Atomkern mit der Ordnungszahl  $Z$  um den Streuwinkel  $\theta$  in einen Raumwinkel  $d\Omega$  gestreut. Für den elastischen Streuwinkel ergibt sich

$$\tan \theta = \frac{2e^2 Z}{mv^2 a}. \quad (3.2)$$

Dieses bedeutet, daß der Streuwinkel  $\theta$  mit wachsender Ordnungszahl  $Z$  des streuenden Atoms zunimmt und mit wachsender Beschleunigungsspannung  $U$ ,

$$eU = E_{\text{kin}} = 1/2 mv^2, \quad (3.3)$$

abnimmt. Der differentielle Streuquerschnitt  $d\sigma/d\Omega$  gibt die Wahrscheinlichkeit für diese Streuung an (Abb. 3.1). Nach Rutherford ergibt sich für den differentiellen Streuquerschnitt

$$\frac{d\sigma_{\text{el}}}{d\Omega} = \left( \frac{e^2 Z}{8\pi\epsilon_0 E} \right)^2 \left( \frac{E + E_0}{E + 2E_0} \right)^2 \frac{1}{\sin^4 \theta/2}, \quad (3.4)$$

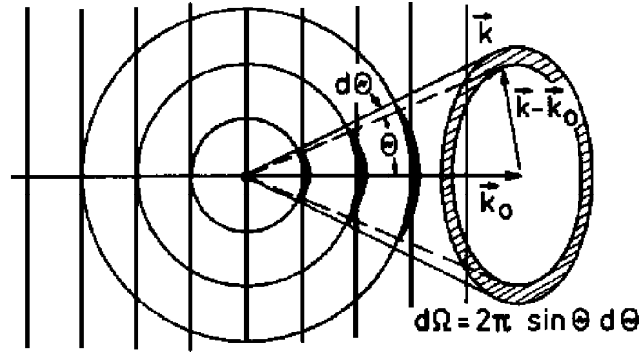
mit  $E_0 = 511 \text{ keV}$  als Ruheenergie und  $E = eU$  als kinetische Energie der Elektronen.

Bei der quantenmechanischen Betrachtung wird das Wellenmodell der Elektronen benötigt (Abb. 3.2). Hier gilt für Elektronen mit  $E = eU$  und  $\vec{p} = m\vec{v}$  die relativistische de Broglie-Wellenlänge

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{hc}{\sqrt{2EE_0 + E^2}}, \quad (3.5)$$

mit  $h$  als Plancksches Wirkungsquantum,  $c$  als Lichtgeschwindigkeit und  $E_0$  als Ruheenergie des Elektrons. Zusätzlich gelten die Verknüpfungen

$$\vec{p} = h\vec{k} \quad \text{und} \quad |\vec{k}| = 1/\lambda \quad (3.6)$$



**Abbildung 3.2:** Quantenmechanische Beschreibung der elastischen Streuung [57].

zwischen Impuls  $\vec{p}$ , der Wellenlänge  $\lambda$  und dem Wellenzahlvektor  $\vec{k}$ , wobei für die ungestreute Welle  $\vec{k}_0$  und für die gestreute Welle  $\vec{k}$  deren Wellenzahlvektoren darstellt.

Die gestreute Welle setzt sich im asymptotischen Grenzfall aus der Überlagerung einer ungestreuten Welle und einer gestreuten Kugelwelle zusammen:

$$\Psi = \Psi_0 [\exp(2\pi i \vec{k}_0 \cdot \vec{r}) + i f(\theta) \frac{1}{r} \exp(2\pi i k r)], \quad (3.7)$$

mit  $\Psi_0$  als Wellenamplitude und der komplexen Streuamplitude

$$f(\theta) = |f(\theta)| \exp(i \eta(\theta)), \quad (3.8)$$

mit  $\eta(\theta)$  als zusätzliche Phasenverschiebung zu der bei jeder Streuung auftretenden Phase  $\exp(-i\pi/2)$ . Der differentielle Streuquerschnitt ist mit der komplexen Streuamplitude über

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = |f(\theta)|^2 \quad (3.9)$$

verknüpft, d. h.  $d\sigma/d\Omega$  ist eine reelle Größe, die nicht von einer Phasenverschiebung abhängig ist.

Da die kinetische Energie bei der elastischen Streuung erhalten bleibt, gilt  $|\vec{k}_0| = |\vec{k}|$  und für die Differenz der Wellenzahlvektoren  $\vec{q}$

$$|\vec{q}| = |\vec{k}_0 - \vec{k}| = 2k \sin(\theta/2) \approx \theta/\lambda. \quad (3.10)$$

Die erste Bornsche Näherung besagt, daß  $f(\theta)$  proportional zur Fouriertransformierten des streuenden Potentials ist, woraus sich

$$f(\theta) = -\frac{2\pi}{\lambda^2} \frac{E + E_0}{E + 2E_0} \int V(\vec{r}) \exp(-2\pi i \vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r}^3 \quad (3.11)$$

ergibt. Hierbei handelt es sich bei dem Potential um das Coulombpotential

$$V(r) = -\frac{e^2 Z}{4\pi\epsilon_0 r} + \sum_{j=1}^Z \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r} - \vec{r}_j|}. \quad (3.12)$$

Der erste Term in Gleichung (3.12) gibt den Beitrag des Atomkerns und der zweite Term den Beitrag der Hüllenelektronen des streuenden Atoms wieder.

Die Abschirmung des Potentials  $V(r)$  mit wachsendem Abstand  $r$  kann mit Hilfe des Wentzelschen Atompotentials [37]

$$V(r) = -\frac{eZ}{4\pi\epsilon_0 r} \exp\left(-\frac{r}{R}\right) \quad (3.13)$$

genähert werden. Hierbei ist  $R$  ein von der Ordnungszahl  $Z$  abhängiger Abschirmradius, bei dem das Potential auf den  $e$ -ten Teil abgefallen ist,

$$R \approx a_H Z^{-1/3} \quad \text{mit} \quad a_H = \frac{\epsilon_0 \hbar^2}{\pi e^2 m_0} = 0,0529 \text{ nm (Bohr-Radius)}. \quad (3.14)$$

Diese Wentzelsche Näherung hat den Vorteil, daß mit Hilfe der Gleichung (3.11) ein analytischer Ausdruck für den differentiellen Streuquerschnitt

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = |f(\theta)|^2 = \frac{4Z^2 R^4 (1 + E/E_0)^2}{a_H^2} \frac{1}{[1 + (\theta/\theta_0)^2]^2}, \quad (3.15)$$

mit  $E_0$  der Ruheenergie und  $\theta_0 = \lambda/2\pi R$ , entsteht [37].  $\theta_0$  ist ein charakteristischer Winkel der elastischen Streuung und ein Maß für die Viertelwertsbreite der elastischen Streuverteilung [57].

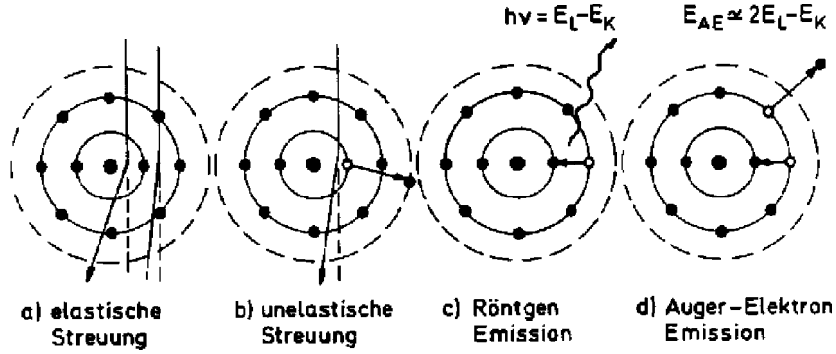
Nach Integration über die Einheitskugel ergibt sich für den totalen elastischen Streuquerschnitt folgender Ausdruck [10]:

$$\sigma_{el} = \int_0^\pi \frac{d\sigma}{d\Omega} 2\pi \sin \theta d\theta \cong \frac{Z^2 R^2 \lambda^2 (1 + E/E_0)^2}{\pi a_H^2} \approx \frac{\hbar^2 Z^{4/3}}{\pi E_0^2 \beta^2} \quad (3.16)$$

mit  $\sin \theta \approx \theta$  und  $\beta = v/c$ .

Der totale elastische Streuquerschnitt  $\sigma_{el}$  hat die Dimension einer Fläche, wobei die Wahrscheinlichkeit, diese Fläche zu treffen, gleich der Wahrscheinlichkeit für eine elastischen Streuung ist. Häufig wird auch anstelle des totalen Streuquerschnittes die mittlere freie Weglänge  $\Lambda = 1/N\sigma_{el}$  benutzt.

Die erste Bornsche Näherung erlaubt auf einfachem Weg, analytische Ausdrücke für den totalen und den differentiellen Streuquerschnitt zu bekommen. Es wird hierfür nur die reelle Streuamplitude  $|f(\theta)|$  mit einem Phasensprung



**Abbildung 3.3:** Schematische Beschreibung der a) elastischen, b) unelastischen Streuung sowie der nachfolgenden Emission eines c) Röntgenquants bzw. d) eines Auger-Elektrons.

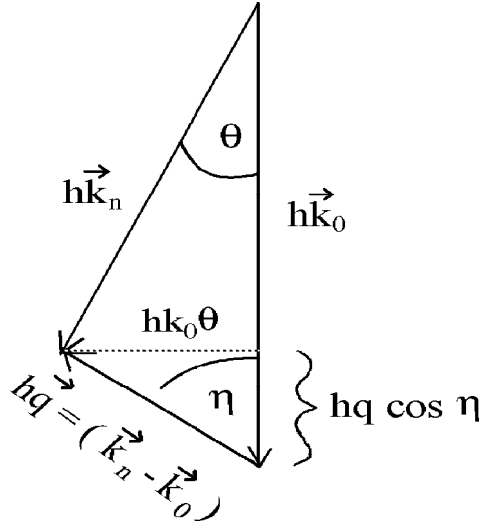
von  $\pi/2$  benötigt ( $\eta(\theta) = 0$ ). Obwohl diese Aussage nur für Elemente niedriger Ordnungszahl gilt, wird sie doch häufig für alle Elemente wegen ihrer Einfachheit bei qualitativen Aussagen über die Streuerverteilung benutzt.

Genauere Berechnungen lassen sich mit der Partialwellen-Methode [59] oder mit der Methode von Wentzel, Kramer und Brillouin [52] anstelle der ersten Bornschen Näherung erreichen. Anstelle des Wentzelschen Potentialansatzes können auch iterativ, über die Schrödinger-Gleichung, gefundene Potentiale („selbstkonsistente Felder“ nach Hartree-Fock bzw. Hartree-Slater [17, 27]) benutzt werden. Mott-Streuquerschnitte berücksichtigen zudem den Elektronenspin und relativistische Effekte in der Dirac-Gleichung [7].

## 3.2 Unelastische Streuung

Bei der unelastischen Streuung gilt analog zur elastischen Streuung die Impulserhaltung und die Erhaltung der Gesamtenergie. Die kinetische Energie der unelastisch gestreuten Elektronen wird fast ausschließlich durch Plasmonenanregung und Ionisation innerer Schalen vermindert. Die angeregten Atome emittieren entweder charakteristische Röntgen-Strahlung oder Auger-Elektronen (Abb. 3.3).

Die thermisch-diffuse Streuung (TDS) wird durch Phononen-Anregung erzeugt. Der Energieverlust durch die TDS ist  $\Delta E_{Ph} \leq 1$  eV, so daß sie mit dem EM 902 nicht herausgefiltert werden kann. Bei der Plasmonenanregung handelt es sich um die mit größter Wahrscheinlichkeit auftretende un-



**Abbildung 3.4:** Vektordiagramm zur Beschreibung der unelastischen Streuung.

elastische Streuung der Primärelektronen im quasifreien Elektronengas des Festkörpers. Der Energieverlust der Primärelektronen liegt dabei im Bereich  $\Delta E_{PI}$  von ca. 5 bis 50 eV.

Bei der Innerschalen-Ionisation der Atome handelt es sich um einen unelastischen Streuprozess eines Primärelektrons mit einem Hüllenelektron des Atoms der untersuchten Probe. Hierbei wird das entsprechende Atom ionisiert, falls die Energie des einfallenden Primärelektrons größer oder gleich der Ionisationsenergie  $E_I$  der entsprechenden Schale des Targetatoms ist. Hieraus ergibt sich die Energie des unelastisch gestreuten Primärelektrons  $E = E_0 - \Delta E$ , mit  $\Delta E$  als Energieverlust des Primärelektrons bei der unelastischen Streuung.

Für den Übergang eines Hüllenelektrons vom Grundzustand in einen angeregten Zustand gelten die Auswahlregeln. Die Differenz der Wellenzahlvektoren kann wie folgt geschrieben werden (Abb. 3.4):

$$\vec{q}^2 = (\vec{k} - \vec{k}_0)^2 \approx k_0^2(\theta^2 - \theta_E^2) \quad (3.17)$$

mit  $\theta_E \simeq \Delta E/2E$  als charakteristischen Winkel der unelastischen Streuung und  $|\vec{k}| \neq |\vec{k}_0|$ .

Mit Hilfe der ersten Bornschen Näherung für die unelastische Streuung ergibt sich für den differentiellen Streuquerschnitt

$$\frac{d\sigma_{\text{unel}}}{d\Omega} = \frac{4\pi^2 m^2}{h^4} \frac{k_n}{k_0} < \Psi_n | V(\vec{r}) | \Psi_0 >^2. \quad (3.18)$$



Die Zustände  $\Psi_0 = u_0 \exp(2\pi i \vec{k}_0 \cdot \vec{r})$  und  $\Psi_n = u_n \exp(2\pi i \vec{k} \cdot \vec{r})$  setzen sich multiplikativ aus einer ein- bzw. auslaufenden Welle des Primärelektrons mit  $\vec{k}_0$  und  $\vec{k}$  sowie den Eigenfunktionen  $u_0$  und  $u_n$  der Elektronen des Targetatoms zusammen.

Setzt man ein Coulombpotential in Gleichung (3.18) ein und nutzt die Beziehung  $\langle u_0 | u_n \rangle = \delta_{0n}$ , so ergibt sich

$$\frac{d\sigma_{\text{unel}}}{d\Omega} = \frac{e^4}{(4\pi\epsilon_0)^2 E \Delta E} \frac{f_{0n}(q)}{(\theta^2 + \theta_E^2)} \quad (3.19)$$

mit der generalisierten Oszillatorenstärke (GOS)

$$f_{0n}(q) = \frac{8\pi^2 m \Delta E}{h^2} |\langle \Psi_n | \vec{u} \cdot \vec{r} | \Psi_0 \rangle|, \quad (3.20)$$

wobei  $\vec{u}$  der Einheitsvektor parallel zu  $\vec{q}$  ist.

Mit der generalisierten Oszillatorenstärke können nur diskrete Energieverluste  $\Delta E$  beschrieben werden. Da aber in den meisten Fällen das Elektron nicht in den Zustand  $\Psi_n$  sondern in das Kontinuum angeregt wird, kommt es somit zu einem kontinuierlichen Energieverlauf. Aus diesem Grund wird die generalisierte Oszillatorenstärke pro Energieintervall  $\Delta E$  definiert. Bei der Integration über den gesamten Energiebereich, unter der Voraussetzung des Wentzelschen Atommodells, erhält man den gemittelten differentiellen Streuquerschnitt

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{\lambda^4 (1 + E/E_0)^2}{4\pi^4 a_H} \frac{Z[1 - (1 + (\theta/\theta_0)^2)^{-2}]}{(\theta^2 + \theta_E^2)^2}. \quad (3.21)$$

Obwohl die Näherungen von Born und Wentzel nur erster Ordnung sind, geben die differentiellen Streuquerschnitte für die elastische und unelastische Streuung wichtige Aussagen über die Streuwahrscheinlichkeiten. Desweiteren liefern die charakteristischen Streuwinkel  $\theta_0$  und  $\theta_E$  wichtige Angaben über die Streuverteilungsbreite.

Für den Fall, daß der Streuwinkel  $\theta$  größer als der charakteristische Winkel der elastischen Streuung  $\theta_0$  ist, gilt für das Verhältnis der differentiellen Streuquerschnitte  $\frac{d\sigma_{\text{unel}}}{d\Omega} / \frac{d\sigma_{\text{el}}}{d\Omega} = 1/Z$ . Hieraus ergibt sich durch eine Integration des differentiellen elastischen (3.15) und des unelastischen Streuquerschnittes (3.21) über  $d\Omega$  die empirisch bestätigte Näherung

$$\nu = \frac{\sigma_{\text{unel}}}{\sigma_{\text{el}}} \approx \frac{20}{Z} \quad (3.22)$$

für das Verhältnis der totalen Streuquerschnitte  $\nu$  [9, 54]. Für Kohlenstoff ergibt sich z. B. ein Verhältnis von  $\nu = 3.3 \pm 0.5$ . Dieses bedeutet, daß bei biologischen Objekten vermehrt unelastische Streuung vorkommt und somit durch die zero-loss Filterung gerade bei leichten Elementen der Streukontrast anwächst [3].

### 3.3 Beugungstheorie

Bei der Beugung treten Interferenzeffekte der gebeugten Wellen auf. Je nach Ordnungsgrad der Atome des Präparates treten unterschiedliche Interferenzmuster auf. Es wird in gasförmige, flüssig amorphe, kristalline und polykristalline Zustände unterschieden.

Bei dem gasförmigen Zustand sind die Atome und somit die Streuzentren in großen unregelmäßigen Abständen angeordnet. Es können daher keine Interferenzen der kohärent gestreuten Wellen auftreten. Es bildet sich eine Intensitätsverteilung  $N|f(\theta)|^2$ .

Bei der flüssig amorphen Probe treten durch die größere Dichte Interferenzeffekte auf. Da es keine konstanten Abstände zwischen den Atomen, sondern nur eine Nahordnung der Streuzentren gibt, bilden sich radiale Dichteverteilungen aus, die durch die Abstände der Atome definiert werden. Hieraus resultieren Oszillationen um die Intensitätsverteilung  $N|f(\theta)|^2$ .

Bei kristallinen Präparaten sind die Streuzentren in einem dreidimensionalen Gitter angeordnet. Dies bedeutet, daß die regelmäßige Anordnung zu einer Ausbildung von Interferenzen führt. Die konstruktive Interferenz führt zum Entstehen einzelner scharfer Bragg-Reflexe. Außerhalb dieser Reflexe liegt destruktive Interferenz vor.

Bei polykristallinen Präparaten, und hierzu zählt auch das aus Hydroxylapatit-Kristalliten aufgebaute Dentin, liegt eine regellose Verteilung von kleinen Kristalliten vor. Durch diese regellose Verteilung der Kristallite treten die Bragg-Reflexe in statistisch verteilten azimuthalen Richtungen auf, wodurch sich bei hinreichend vielen Reflexen Debye-Scherrer-Ringe bilden.

### 3.3.1 Struktur- und Gitteramplitude

Die Amplitude der elastisch gestreuten Welle in  $\vec{k}$ -Richtung kann über die Fouriertransformation der Gitterabstände bestimmt werden. Jedes Atom  $k$  ( $k = 1, \dots, n$ ) der Elementarzelle streut die Welle mit einer charakteristischen Streuamplitude  $f_k$ . Betrachtet man den Kristall als ein Parallelepiped mit Kantenlängen  $L_i = M_i a_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) parallel zu den Einheitsvektoren  $\vec{a}_i$ , so ergibt sich die Fouriersumme  $A$

$$A = \sum_{m=1}^{M_1} \sum_{n=1}^{M_2} \sum_{o=1}^{M_3} \sum_{k=1}^n f_k \exp[-2\pi i (\vec{k} - \vec{k}_0) \cdot (\vec{r}_k + \vec{r}_g)] , \quad (3.23)$$

mit  $\vec{r}_k$  als Translations- und  $\vec{r}_g$  als Lage-Vektor der Elementarzelle. Diese Summation kann in 2 Faktoren, der Strukturamplitude  $F$  und der Gitteramplitude  $G$  mit

$$F = \sum_{k=1}^n f_k \exp[-2\pi i (\vec{k} - \vec{k}_0) \cdot \vec{r}_k] \quad (3.24)$$

$$G = \sum_{m=1}^{M_1} \sum_{n=1}^{M_2} \sum_{o=1}^{M_3} \exp[-2\pi i (\vec{k} - \vec{k}_0) \cdot \vec{r}_g] \quad (3.25)$$

aufgespalten werden. Die Strukturamplitude hängt nur von dem Atomaufbau der Elementarzelle mit den Atomformfaktoren  $f_k$  ab. Die Gitteramplitude hingegen wird nur durch den externen Kristallaufbau definiert und ist deshalb von der Einhaltung der Bragg-Lage abhängig. Die Bragg-Bedingung ist in vektorieller Schreibweise durch  $(\vec{k} - \vec{k}_0) = \vec{g}$  gegeben, wobei  $\vec{g}$  ein reziproker Gittervektor ist.

Im folgenden sei  $\vec{s}$  ein kleiner Anregungsfehler aus der Bragg-Lage, so gilt  $\vec{k} - \vec{k}_0 = \vec{g} + \vec{s}$ . Zwischen dem Betrag  $s$  des Anregungsfehlers und dem Verkipfungswinkel  $\Delta\theta$  aus der Bragg-Lage besteht die Beziehung:

$$s = g\Delta\theta = \frac{\Delta\theta}{d_{\text{hkl}}} = \frac{2 \sin \theta_B}{\lambda} \Delta\theta . \quad (3.26)$$

Unter der Berücksichtigung, daß  $\vec{g} \cdot \vec{a}_i = n$  (ganzzahlig) und  $\sin(2\pi n) = 1$  ist, ergibt sich für die Gitteramplitude:

$$G = \sum_{mno} \exp[2\pi i (\vec{g} + \vec{s}) \cdot \vec{r}_g] = \sum_{mno} \exp \underbrace{[2\pi i \vec{s} \cdot \vec{r}_g]}_{\Phi} . \quad (3.27)$$

Da sich die Phase  $\Phi$  nur sehr wenig von Elementarzelle zu Elementarzelle verändert, kann die Dreifachsumme durch ein Integral über das Kristallvolumen ersetzt werden. Die Kantenlängen seien durch  $L_i$  und das Volumen der

Elementarzelle durch  $V_e = a_1 a_2 a_3$  gegeben, so ergibt sich

$$G = \frac{1}{V_e} \int_{-L_1/2}^{+L_1/2} \int_{-L_2/2}^{+L_2/2} \int_{-L_3/2}^{+L_3/2} \exp[-2\pi i (s_1 x_1 + s_2 x_2 + s_3 x_3)] dx_1 dx_2 dx_3 . \quad (3.28)$$

In dieser Form kann die Gitteramplitude in die einzelnen Faktoren  $G_1$ ,  $G_2$  und  $G_3$  aufgespalten werden. Für den Faktor  $G_1$  folgt

$$G_1 = \frac{1}{a_1} \int_{-L_1/2}^{+L_1/2} \exp(2\pi i s_1 x_1) = \frac{\sin(\pi s_1 M_1 a_1)}{\pi s_1 a_1} , \quad (3.29)$$

wobei für die beiden anderen Faktoren entsprechende Ausdrücke gelten. Die totale reflektierte Intensität ergibt sich jetzt als Amplitudenquadrat [53]

$$\begin{aligned} I &= \lambda^2 |F|^2 |G|^2 \\ &= \lambda^2 |F|^2 \frac{\sin^2(\pi s_1 M_1 a_1)}{(\pi s_1 a_1)^2} \frac{\sin^2(\pi s_2 M_2 a_2)}{(\pi s_2 a_2)^2} \frac{\sin^2(\pi s_3 M_3 a_3)}{(\pi s_3 a_3)^2} . \end{aligned} \quad (3.30)$$

Sei  $t = M_3 a_3$  die Schichtdicke der einkristallinen Folie, so ergibt sich die pro Flächeneinheit gebeugte Intensität zu

$$I = \frac{\lambda^2 |F|^2}{V_e^2} \frac{\sin^2(\pi t s)}{(\pi s)^2} . \quad (3.31)$$

### 3.3.2 Bragg–Bedingung

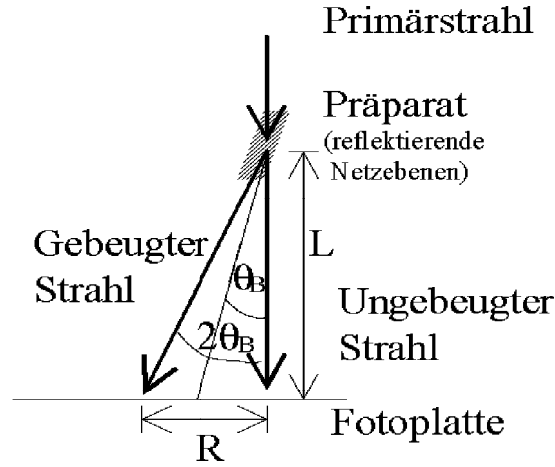
Bei der geometrischen Herleitung der Bragg-Bedingung werden in zwei benachbarten Netzebenen, mit dem Netzebenenabstand  $d_{\text{hkl}}$ , zwei benachbarte Atome betrachtet. Eine unter dem Glanzwinkel  $\theta_B$  einfallende ebene Welle wird an den Atomen unter dem Winkel  $2\theta_B$  gegen die einfallende Welle elastisch gestreut. Unter der Bedingung der konstruktiven Interferenz, bei einem Wegunterschied  $n\lambda$  der gestreuten Welle, ergibt sich für die Bragg–Bedingung

$$2 d_{\text{hkl}} \sin \theta_B = n \lambda , \quad (3.32)$$

mit  $n$  als ganze Zahl. Im folgenden wird nur auf den Reflex erster Ordnung  $n = 1$  Bezug genommen.

Aus der geometrischen Betrachtung des Strahlenverlaufs nach der Beugung (Abb. 3.5) ergibt sich die Beziehung

$$\tan 2 \theta_B = \frac{R}{L} \quad (3.33)$$



**Abbildung 3.5:** Ableitung der Grundformel der Elektronenbeugung.

mit  $L$  als Kameralänge und  $R$  als Radius des Debye–Scherrer–Ringes. Da in einem TEM bei der Elektronenbeugung nur kleine Winkel im Bereich  $0^\circ \leq \theta_B \leq 3^\circ$  auftreten, kann die Näherung

$$2 \sin \theta_B \approx 2 \theta_B \approx \tan 2 \theta_B \quad (3.34)$$

benutzt werden. Mit dieser Beziehung folgt aus den Gleichungen (3.32) und (3.33) die Grundformel der Elektronenbeugung

$$d_{hkl} R \approx \lambda L \quad \text{mit} \quad \lambda L \text{ als Beugungskonstante,} \quad (3.35)$$

und  $\lambda = 4.174 \text{ pm}$  bei 80 kV Beschleunigungsspannung [56].

### 3.3.3 Intensität der Debye–Scherrer–Ringe

Bei polykristallinen Proben ist die Intensität der Beugungsreflexe von der Kristallitgröße abhängig. Bei einer Beschleunigungsspannung  $U = 80 \text{ kV}$  und einer Kristallitgröße  $t < 5 \text{ nm}$  kann die kinematische, bei Kristallitgrößen  $t > 5 \text{ nm}$  muß die dynamische Beugungstheorie zur Beschreibung der Beugung herangezogen werden [56].

**Die kinematische Theorie** geht nur von Einfachstreuungen aus, d. h. alle interferierenden Streuwellen werden von einer einfallenden Welle angeregt, und es kommt zu keiner nennenswerten Mehrfachstreuung. Die Ringintensitäten  $I_{hkl}$ , mit  $hkl$  als Millersche Indizes der Netzebenen, ergeben sich

durch eine Mittelung über alle Kristallorientierungen [34]:

$$I_{\text{kin}} = I_{\text{hkl}} = j_0 \frac{2\pi^2 m^2 e^2}{h^4} K N V_e P_{\text{hkl}} |V_b|^2 \lambda^2 d_{\text{hkl}} \quad (3.36)$$

mit  $j_0$  als Primärstromdichte am Ort des Objektes,  $K$  als Anzahl der Kristallite mit durchschnittlich  $N$  Elementarzellen und deren Volumen  $V_e$ ,  $P_{\text{hkl}}$  als die Multiplizität der hkl-Ebene und  $V_b$  als temperaturabhängiges Gitterpotential.

Für den Geltungsbereich der kinematischen Theorie bedeutet die obige Gleichung, daß die Ringintensität nicht von der Größe und Form der Kristallite abhängig ist, sondern nur von der Gesamtzahl der vom Elektronenstrahl getroffenen Elementarzellen. Die Intensitätsverhältnisse verschiedener Ringe untereinander sind ebenfalls nicht von der Kristallitgröße und der Wellenlänge abhängig, sondern nur von den Größen  $P_{\text{hkl}}$ ,  $|V_b|$  und  $d_{\text{hkl}}$  des betreffenden Reflexes.

**Die dynamische Theorie** geht davon aus, daß die gestreute Welle auch wieder einfallende Welle für andere Streuzentren sein kann. Der einfachste dynamische Fall ist der Zweistrahlfall, bei dem nur der Primärstrahl und der gebeugte Strahl berücksichtigt werden. Bei der dynamischen Theorie ergibt sich für die Ringintensität

$$I_{\text{dyn}} = I_{\text{kin}} \frac{1}{A_{\text{hkl}}} \int_0^{A_{\text{hkl}}} J_0(2x) dx \quad (3.37)$$

mit  $J_0$  als Besselfunktion nullter Ordnung,  $A_{\text{hkl}} = c|V_b|D$ , wobei  $c$  die Lichtgeschwindigkeit und  $D$  der Kristalldurchmesser ist [4].

Wenn die Funktion  $A_{\text{hkl}}$  sehr klein ist, sei es durch einen kleinen Kristalldurchmesser  $D$  oder einer kleinen Wellenlänge  $\lambda$ , geht die dynamische Theorie in die kinematische Theorie über. Im Bereich der dynamischen Theorie gilt, wegen der Abhängigkeit von  $A_{\text{hkl}}$ , nicht mehr die Unabhängigkeit der Ringintensitäten von der Größe der Kristallite [50].

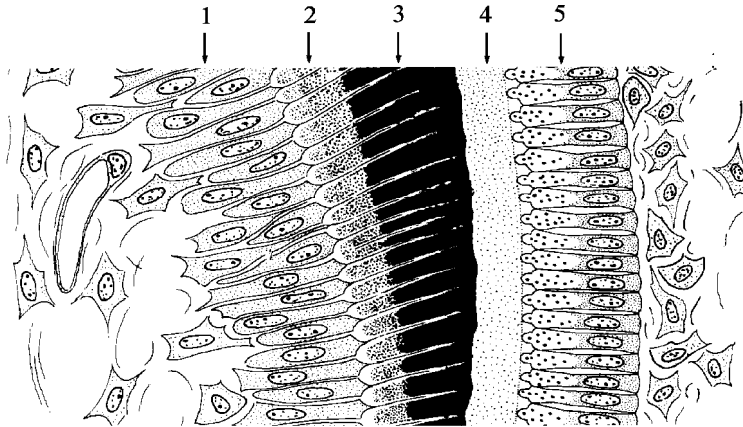
## 4 Präparation

### 4.1 Material und Methoden

In einer Ätherkammer werden junge Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von etwa 50 bis 90 g und junge Spargue-Darley-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 60 bis 70 g anästhesiert. Anschließend werden die Incisoren von Unter- und Oberkiefer mit deren Wurzeln freigelegt. Nach der Freilegung werden die Incisoren vollständig separiert und mittels mit flüssigem Stickstoff ( $\text{LN}_2$ ) gekühlten flüssigem Propan kryofixiert (Abb. 4.2). Propan hat den Vorteil, daß es in einem großen Temperaturbereich flüssig ist (Siedepunkt  $T \simeq -44,5^\circ\text{C}$  und Gefrierpunkt  $T \simeq -190^\circ\text{C}$ ).

Bei der Fixierung entstehen in der Probe Eiskristallite, deren Größe etwa umgekehrt proportional zur Wurzel aus der Abkühlgeschwindigkeit des Wassers im dentalen Hartgewebe ist [24, 50]. Im Idealfall sollte die Probe vitrifizieren, d. h. glasartig erstarren, was eine Abkühlgeschwindigkeit von mehr als  $10\,000^\circ\text{C/s}$  voraussetzt [68]. Langsamere Abkühlgeschwindigkeiten haben Strukturveränderungen, ja sogar Zerstörungen des Gewebes durch die entstehenden Eiskristalle zur Folge. Desweiteren können bei langsam gefrierenden Proben keine Aussagen über lokale Verteilungen wasserlöslicher Substanzen getätigt werden, da es in der flüssigen Phase zu einem Ionen-Konzentrations-Gradienten kommt.

Bei der Präparation der Incisoren betrug die Zeit zwischen der Entnahme der Zähne und deren Kryofixation 1 bis 3 min. Aus diesem Grund kann eine umfangreiche Ionenwanderung zwischen den Odontoblasten und dem Prädentin ausgeschlossen werden (Abb. 4.1). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff bei  $T \simeq -90^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Untersuchung zwischengelagert.



**Abbildung 4.1:** Schematischer Querschnitt der Zahnentwicklung [38]

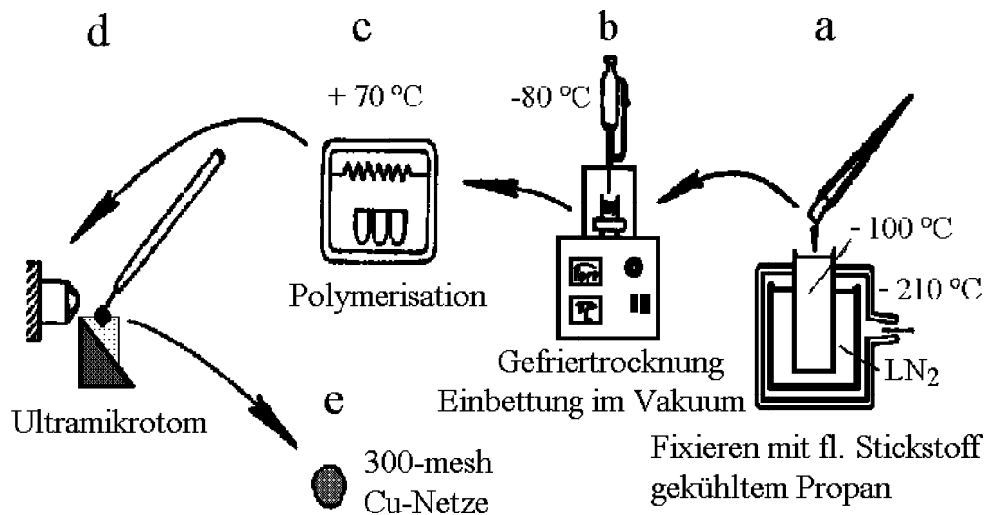
1) Odontoblasten, 2) Prädentin, 3) Dentin mit Odontoblastenfortsätzen, 4) Zahnschmelz, 5) Ameloblasten

## 4.2 Ultradünnschnitte eingebetteter Ratten-Incisoren

Nach der Fixierung wird das dentale Hartgewebe in ein Gefrier-Trocknungsgefäß gebracht (Abb. 4.2), was auf eine Temperatur von etwa  $-70^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt ist. Bei einem Vakuum von etwa 0,1 Pa sublimiert das Eis zu Wasserdampf, welcher teilweise abgepumpt wird und teilweise in einer Kühlfalle der Vakuumanlage kondensiert. In der Anlage wird zusätzlich zur Gefrier-trocknung das Trocknungsmittel  $\text{P}_2\text{O}_5$  verwendet.

Nach vollständiger Sublimation, etwa nach 7 Tagen, wird das gefriergetrocknete Hartgewebe kurzzeitig im Vakuum aufgewärmt, um das flüssige Einbettungsmittel zu infiltrieren (Abb. 4.2). Zur Formgebung des Präparatblockes lag das Gewebe bei der Einbettung in einer Gelantinekapsel. Als Einbettungsmittel wurde „Spurr-Harz“, ein spezielles aliphatisches Epoxid-Harz, bestehend aus flüssigem chlorfreien Epon, verwendet [67]. Das Aufwärmen und Einbetten wird im Vakuum vorgenommen, da das entwässerte Gewebe stark hygroskopisch ist und bei Luftzutritt sofort Feuchtigkeit aufnimmt. Beim Einbetten wird weiter auf eine Temperatur von etwa  $0^{\circ}\text{C}$  geachtet, um einer vorzeitigen Entstabilisierung des Harzes vorzubeugen. Nach der Infiltration wird das Präparat für etwa 1 bis  $1\frac{1}{2}$  Tage zur Polymerisation in einen trockenen Wärmeschränk bei etwa  $70^{\circ}\text{C}$  gebracht.





**Abbildung 4.2:** Schematischer Präparationsweg ultradünner eingebetteter dentaler Hartgewebsschnitte. a) Fixierung in mit flüssigem  $\text{LN}_2$  gekühlten Propan b) Gefriertrocknung und Einbettung im Vakuum c) Polymerisation d) Ultradünnschnitte mit Ultramikrotom e) Auffangen auf 300-mesh Cu-Netzen.

Bevor Dünnschnitte mittels eines Ultramikrotoms hergestellt werden können, muß die Probe mit einem Rasiermesser getrimmt werden, d. h. der Präparatblock wird pyramidenförmig angeschnitten, da Ultradünnschnitte nicht in beliebiger Flächengröße hergestellt werden können [44]. Zum Schneiden der Dünnschnitte wurde das Ultramikrotom OM U 2 der Firma Reichert mit einem Diamantmesser „DIATOME“ benutzt. Bei diesem Ultramikrotom wird die Schnittdicke durch einen thermischen Vorschub geregelt (Abb. 4.3). Eine Glühbirne (G) steuert durch thermische Strahlung den Vorschubblock (B), zuvor wird mittels einer Mikrometerschraube (S) eine Grobpositionierung eingestellt. Der Schnittwinkel kann entweder durch die Messerhalterung (M) oder durch die Präparatehalterung (P) variiert werden.

Ein Flüssigkeitstrog an dem Diamantmesser (M), gefüllt mit destilliertem Wasser, dient zum Auffangen der Dünnschnitte, damit sie nicht als trockene Schnitte an dem Rücken des Messers hängen bleiben (Abb. 4.2 d). Hierbei wurde darauf geachtet, daß die Schnitte einen nur sehr kurzen, zeitlich definierten Wasserkontakt hatten, da bei Wasserkontakt lösliche Komponenten ausgewaschen werden können [47, 48]. Während des Schneidens kann eine grobe Schnittdickenbestimmung durchgeführt werden. Neben der Lupe (L)

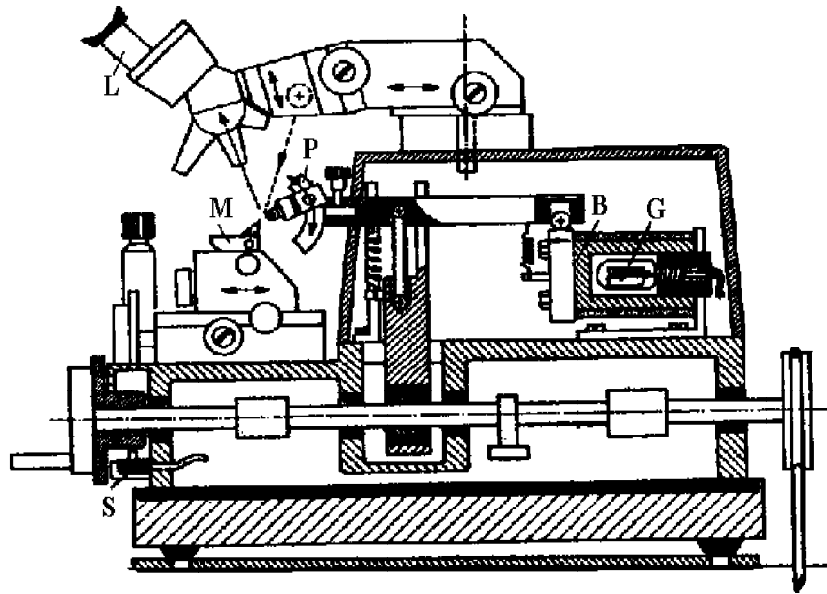


Abbildung 4.3: Prinzip eines Ultramikrotoms [50].

G: Glühlampe, B: Vorschubblock, S: Mikrometerschraube  
M: Diamantmesser, P: Präparathalter, L: Lupe

des Mikrotoms ist eine Kaltlichtleuchte angebracht, die die Dünnschnitte auf der Wasseroberfläche des Auffangtroges senkrecht beleuchtet. Je nach Schnittdicke entsteht eine entsprechende Interferenzfarbe (Tabelle 4.1).

## 4.3 Schnittdickenbestimmung

Während der Herstellung der Ultradünnschnitte wurde die Schnittdicke mit der Interferenz-Methode bestimmt, da sie schnell einen Überblick über den Schnittdickenbereich angibt. Zur Absicherung, daß diese Ultradünnschnitte im Bereich von 50 bis 80 nm liegen, sind Vergleichsmessungen mit der Transmissionsmessung der einfallenden Elektronen durchgeführt worden.

### 4.3.1 Interferenzfarben-Methode

Das reflektierte Licht, einer senkrecht zum Schnitt ausgerichteten Kaltlichtleuchte, zeigt spektrale Zusammensetzung unterschiedlicher Interferenzfarben in Abhängigkeit der Dicke des Schnittes (Tab. 4.1). Diese Interferenzfarben können während der Herstellung der Ultradünnschnitte zu einer schnellen Bestimmung der ungefähren Schnittdicke benutzt werden. Bei den

Interferenzfarbe	Schnittdicke $t$ in nm
grau	$< 60$
silber	$60 - 90$
gold	$90 - 150$
purpur	$150 - 190$
blau	$190 - 240$
grün	$240 - 280$
gelb	$280 - 320$

**Tabelle 4.1:** Farbskala der Interferenzfarben von Dünnschnitten bei unterschiedlichen Schichtdicken  $t$  [46].

Interferenzfarben der Tabelle 4.1 muß berücksichtigt werden, daß der Schnitt senkrecht bestrahlt wird. Falls das Licht unter dem Winkel  $\theta$  einfällt, muß die beobachtete Schnittdicke  $t_{\text{beob}}$  in Abhängigkeit vom Einfallswinkel  $\theta$  und somit von dem optischen Wegunterschied mittels

$$t_{\text{kor}} = t_{\text{beob}} \left( 1 - \frac{\sin^2 \theta}{n^2} \right)^{1/2} \quad (4.1)$$

korrigiert werden, wobei  $n$  der Brechungsindex des Einbettungsharzes ist [50]. Diese Methode hat den großen Nachteil, daß sie nur für Schnitte  $t \geq 50$  nm benutzt werden kann und einen großen Intervallbereich pro Interferenzfarbe abdeckt. Da es beim dentalen Hartgewebe problematisch ist, Dünnschnitte mit  $t \leq 50$  nm herzustellen, werden bei den Untersuchungen Ultradünnschnitte ( $t = 50 - 80$  nm) verwendet. Diese Interferenz-Methode zeigte für diesen Schnittdicken-Bereich ausreichende Ergebnisse.

### 4.3.2 Transmissionsmessung

Bei der Schnittdickenbestimmung durch Messung der transmittierten Elektronen muß berücksichtigt werden, daß nur amorphe und feinkristalline ultradünne Präparate bestimmt werden können [51, 56], da bei grob- bis einkristallinen Präparaten die Transmission der Elektronen durch die dynamische Theorie der Elektronenbeugung beeinflusst wird [56]. Aus diesem Grund werden bei den Messungen Maschen des Einbettungsharzes mit amorphen Bereichen ausgewählt.

Beim Passieren des Präparates erfahren die Elektronen Energieverbreiterungen und Streuwinkel durch die elastischen und unelastischen Streuprozesse in der Probe. Die Objektivaerturbundle in der hinteren Brennebene der Objektivilinse bestimmt die Apertur  $\alpha$ . Elektronen mit einem Streuwinkel  $\theta$  größer als die Apertur  $\alpha$  werden durch die Aperturbundle abgefangen. Dieses bedeutet, daß die transmittierte Intensität der Elektronen in Abhängigkeit von der Objektivaerturbundle, der Massendicke  $x$  und der chemischen Zusammensetzung der Probe geschwächt wird. Die Massendicke ist gegeben durch  $x = \rho t$ , mit  $\rho$  als Dichte und  $t$  als Schichtdicke.

Durch elastische Streuprozesse erfährt die einfallende Strahlstromdichte  $I$  eine Schwächung  $dI_{\text{el}}$

$$\frac{dI_{\text{el}}}{I} = -\sigma_{\text{el}}(\alpha) \frac{N_A}{A} dx = -\frac{dx}{x_{\text{el}}(\alpha)} \quad (4.2)$$

mit  $N_A$  als Avogadro-Konstante,  $A$  als Atomgewicht und dem durch die Apertur eingeschränkten partiellen Streuquerschnitt

$$\sigma_{\text{el}}(\alpha) = \int_{\alpha}^{\infty} \frac{d\sigma_{\text{el}}}{d\Omega} 2\pi\theta d\theta = \frac{\sigma_{\text{el}}}{1 + (\alpha/\theta_0)^2} , \quad (4.3)$$

mit dem totalen elastischen Streuquerschnitt  $\sigma_{\text{el}}$  nach Gleichung (3.16).

Die durch unelastische Streuprozesse gegebene Schwächung  $I_{\text{in}}$  der transmittierten Elektronen ergibt sich analog:

$$\frac{dI_{\text{in}}}{I} = -\sigma_{\text{in}}(\alpha) \frac{N_A}{A} dx = -\frac{dx}{x_{\text{in}}(\alpha)} \quad (4.4)$$

mit dem differentiellen unelastischen Streuquerschnitt  $d\sigma_{\text{in}}/d\Omega$  aus Gleichung (3.21) und dem partiellen unelastischen Streuquerschnitt [37]

$$\sigma_{\text{in}}(\alpha) = \int_{\alpha}^{\infty} \frac{d\sigma_{\text{in}}}{d\Omega} 2\pi\theta d\theta = \frac{\sigma_{\text{el}}}{Z} \left\{ -\frac{1}{1 + (\alpha/\theta_0)^2} + 2 \ln[1 + (\alpha/\theta_0)^{-2}] \right\} . \quad (4.5)$$

Der gesamte Intensitätsverlust der transmittierten Elektronen, die noch die Objektivaerturbundle im Winkelbereich  $0 < \theta < \alpha$  passieren, beträgt

$$\frac{dI}{I} = -[\sigma_{\text{el}}(\alpha) + \sigma_{\text{in}}(\alpha)] \frac{N_A}{A} dx = -\frac{dx}{x_{\text{k}}(\alpha)} , \quad (4.6)$$

mit  $x_{\text{k}}(\alpha)$  als Kontrastdicke.

Mit  $I = I_0$  bei  $x = 0$  ergibt sich die ungefilterte Transmission der Elektronen  $T_{\text{unf}}$  aus der Integration über die Massendicke (4.6):

$$T_{\text{unf}} = \frac{I}{I_0} = \exp\left[\frac{-x}{x_k(\alpha)}\right]. \quad (4.7)$$

Aus dieser Gleichung (4.7) ergibt sich eine Abschwächung der Transmission, die exponentiell mit der Massendicke  $x$  abnimmt. In der Abbildung 4.4 wird die ungefilterte Transmission als Kontrast  $K$

$$K = -\log T_{\text{unf}} = -\log \frac{I}{I_0} \quad (4.8)$$

für 80 keV Elektronen und verschiedenen Aperturen  $\alpha$  dargestellt [57].

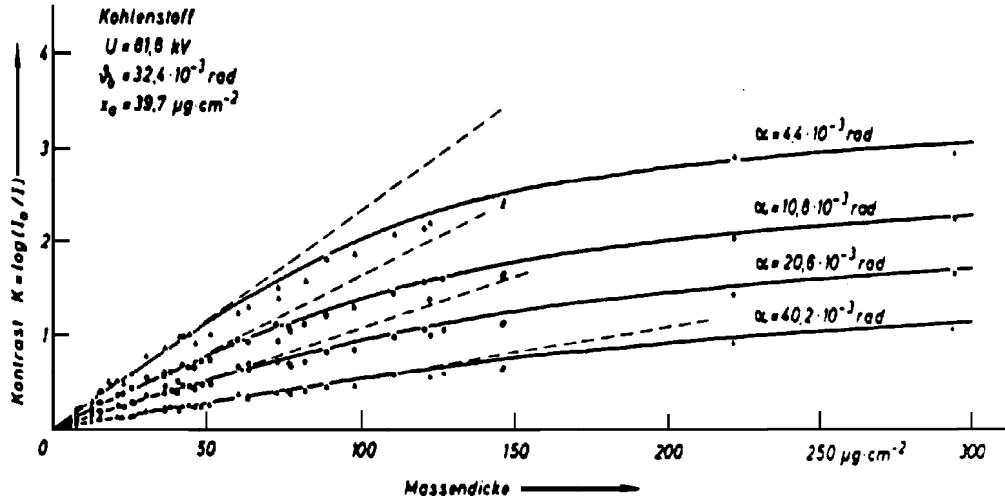


Abbildung 4.4: Kontrast  $K$  als Funktion der Massendicke  $x$  von Kohlenstoff-Präparaten bei unterschiedlichen Aperturen  $\alpha$  [57].

Bei Massendicken  $x \leq 40$  bis  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ist das Exponentialgesetz nahezu erfüllt (Abb. 4.4), weicht aber mit zunehmender Massendicke immer weiter ab. Dieses ergibt sich dadurch, daß bei größeren Massendicken die in größere Winkel  $\theta > \alpha$  gestreuten Elektronen durch Mehrfachstreuung wieder in kleinere Winkel zurückgestreut werden und dann die Objektivaperturblende passieren können.

Bei gegebener Objektivapertur  $\alpha$  kann der Kontrast  $K$  durch ein empirisches Gesetz in Abhängigkeit von der Ordnungszahl  $Z$  beschrieben werden [50]:

$$K = -\log T_{\text{unf}} \cong \frac{bZ^a}{A} x, \quad (4.9)$$

mit den Konstanten  $a$  und  $b$ , die sich aus der Apertur  $\alpha$  und der Elektronenenergie  $E$  ergeben [52].

Die Probe sei aus einer Verbindung mit  $p_i$  Atomen der Ordnungszahl  $Z_i$  und dem Atomgewicht  $A_i$  aufgebaut, so ergibt sich das Molekulargewicht  $M = \sum p_i A_i$ . Die Atome pro Flächeneinheit  $n_i$  und die Moleküle pro Flächeneinheit  $n$  werden durch die Beziehungen

$$n_i = \frac{N_A}{A_i} x_i \quad \text{und} \quad n = \frac{N_A}{M} x \quad (4.10)$$

gegeben, wobei sich die Atome  $p_i$  wie folgt beschreiben lassen:

$$p_i = \frac{n_i}{n} = \frac{x_i M}{A_i x} \quad \Longleftrightarrow \quad x_i = \frac{1}{M} p_i A_i x . \quad (4.11)$$

Hieraus ergibt sich für die ungefilterte Transmission bei einer Verbindung mit  $i$  Komponenten (vergl. Gleichung (4.7))

$$T_{\text{unf}} = \frac{I_{\text{unf}}}{I_0} = \exp \sum \frac{x_i}{x_{k_i}(\alpha)} . \quad (4.12)$$

Aus den Gleichungen (4.11) und (4.12) erfolgt für die Bestimmung der MasSENDICKE:

$$\begin{aligned} K &= -\log T_{\text{unf}} = \log I_0 / I_{\text{unf}} \\ &\cong \sum_i \frac{b Z_i^a}{A_i} x_i = \frac{1}{M} \left( \sum_i b Z_i^a p_i \right) x \end{aligned} \quad (4.13)$$

$$\Longleftrightarrow \quad x = \frac{M}{\sum b Z_i^a p_i} \log I_0 / I_{\text{unf}} . \quad (4.14)$$

Die Intensitäten  $I_0$  und  $I_{\text{unf}}$  werden durch einen Faradaykäfig oder wie in dieser Arbeit mittels einer Szintillator–Photomultiplier–Kombination unterhalb des Kameraraumes registriert. Das durch die Elektronen erzeugte Signal wird mit einem Multimeter abgelesen. Die Intensität  $I_0$  wird ohne Präparat und nur mit eingeschobener Objektivaperturblende aufgenommen. Anschließend wird unter den gleichen Bedingungen das erzeugte Signal der ungefilterten transmittierten Elektronen des Ultradünnschnittes bestimmt. Es werden hierbei Maschen ausgewählt, die nur mit dem amorphen Spurr–Harz bedeckt sind, sowie Maschen, in denen die annähernd amorphen Prädentin–Bereiche vorliegen. Die abgeschätzte Varianz in der Schnittdicke bei den Ultradünnschnitten liegt dabei in der Größenordnung von  $\pm 10$  bis 15% [49].

## 5 Dentinbildung von Ratten–Incisoren

Der größte Teil des Zahns besteht aus dem Zahnbein, dem Dentin. Es handelt sich dabei um ein gelblich–weißes Gewebe, welches die Zahnhöhle mit der Zahnpulpa umhüllt und die Grundlage des Zahns bildet. Es stellt ähnlich dem Zement und Knochen ein kollagenreiches Hartgewebe dar, wohingegen der Zahnschmelz starke Unterschiede zum Dentin aufweist. Die Dentinogenese, das Dentinwachstum, ist bei Ratten–Incisoren nicht auf die Zeit vor dem Zahndurchbruch beschränkt, sondern über die ganze Lebenszeit des Zahns ausgedehnt.

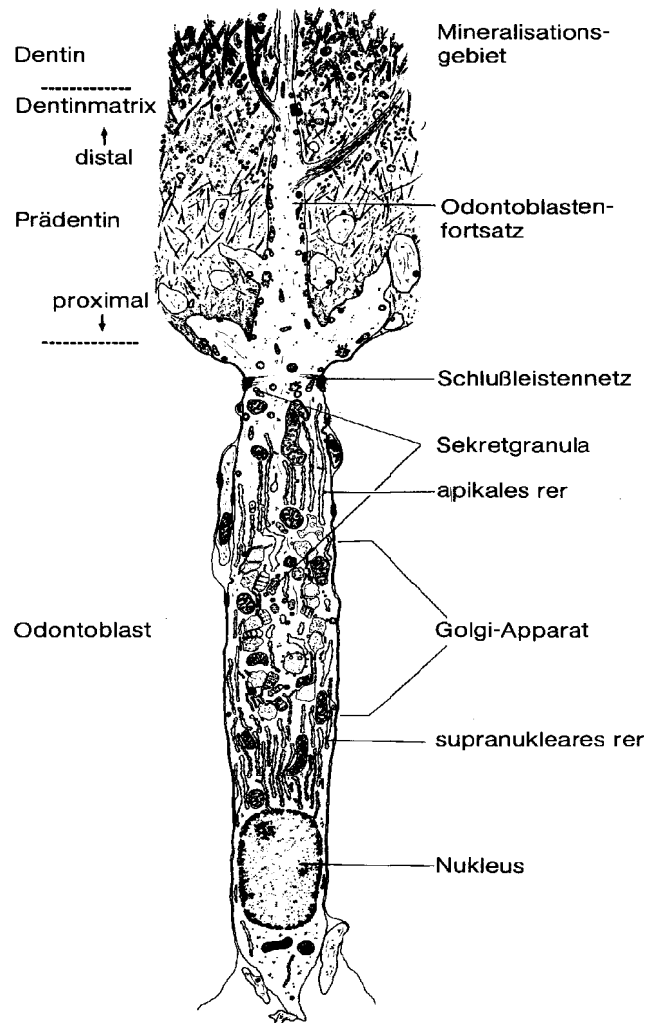
Die Zahnentwicklung als Ganzes ist ein dynamischer Prozeß, der vom embryonalen Zustand bis hin zum Tode dauert. Er führt über mehrere Schritte zur Bildung des dentalen Hartgewebes. Zuerst werden inkonsistente mesenchymale Gewebe gebildet, die dann in typische Hartgewebszellen umgeformt werden. Im Einklang hierzu steht die Bildung verschiedener kollagener und nichtkollagener Proteine. Die beiden letzten Schritte der dentalen Hartgewebsbildung beschreiben die Vorstufe der beginnenden Mineralisierung, das Prädentin, und die Reifung der Kristallite zum Zahnbein, das Dentin. In dieser Arbeit wird der Reifungsprozeß des Dentins mittels der zero-loss gefilterten Elektronenbeugung näher untersucht.

### 5.1 Ausbildung der Dentinmatrix

Das Dentin wird durch spezifische Zellen, die Odontoblasten (Abb. 5.1), gebildet und später versorgt. Sie haben ihren Ursprung im Mesenchym der Zahnpapille [35]. Der Odontoblast ist eine schlanke, säulenförmige Zelle, etwa 40 bis 50  $\mu\text{m}$  lang und 7  $\mu\text{m}$  breit [66], und besitzt einen starken, sich stetig verlängernden zytoplasmatischen Fortsatz. Seitlich von diesem Odontobla-

stenfortsatz laufen zahlreiche dünne und relativ kurze zytoplasmatische Seitenäste aus. Der Zellkern liegt weit basal im Zytoplasma, das eine geordnete Organellenverteilung aufweist. Am distalen Ende befindet sich das Schlußleistennetz, welches benachbarte Odontoblasten miteinander verbindet und den Interzellularraum gegen die Dentinseite verschließt.

In den Odontoblasten synthetisieren hauptsächlich dentale Hartgewebsproteine wie Prokollagen, Glykoproteine, Glykosaminoglykane und Phosphoproteine. Diese dentalen Bausteine werden am distalen Schlußleistensystem um den Stamm des Odontoblastenfortsatzes ausgeschieden und bilden das Prädentin als organisches Vorstadium der Mineralisation. Die Breite der Prädentinschicht beträgt bei Ratten-Incisoren etwa  $15\text{ }\mu\text{m}$  [49].



**Abbildung 5.1:** Schematisch: Struktur und topologische Lage eines Odontoblasten mit seinem Fortsatz im Bereich der Dentinbildungsfrente [70].



Die Dentinbildungsfront liegt hierdurch im deutlichen Abstand zur Odontoblastenschicht. Da sich durch die stetige Sekretion die Odontoblasten zurückbilden, schreitet die initiale Dentinbildung in apikaler Richtung voran, während koronal die bereits eingeleitete Dentinbildung fortgesetzt wird und das Dentin an Dicke zunimmt [66].

## 5.2 Aufbau der Kristallite

Die organische Dentinmatrix ist zu 91 bis 92% aus Kollagen und zu 8 bis 9% aus nichtkollagener Grundsubstanz aufgebaut [28, 61]. Das Kollagen ist fast ausschließlich vom Typ I [66].

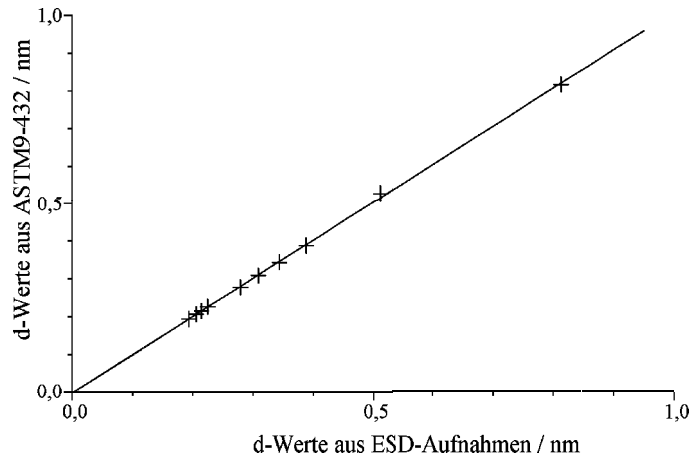
Die wichtigsten Elementgruppen zur Bildung der Dentinkristallite sind Kalzium- und Phosphat-Gruppen [49, 66]. Der Phosphat- und auch ein Kalzium-Anteil kommen im Prädentin als Ionen oder als kleinere Moleküle vor. Der andere Kalzium-Anteil ist verstärkt an nichtkollagenen Makromoleküle wie Phosphoproteine, Glykoproteine und Glykosaminoglykane gebunden. Im Prädentin ist die Kalzium-Konzentration relativ konstant, wächst aber im Abstand von 0.5 bis 1.5 nm von der Prädentin/Dentin-Grenze zum Dentin hin an [48, 49, 71].

Zur Ermittlung der Kristallstruktur des Dentins werden zero-loss gefilterte Elektronenbeugungs-Aufnahmen erstellt. Zuerst wird die Beugungskonstante  $\lambda L$  (Kap. 3.3.2) mit Beugungsreflexen eines Gold-Standards bestimmt. Gold hat ein kubisch-flächenzentriertes Kristallgitter mit dem Netzebenenabstand

$$d_{\text{hkl}} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} , \quad (5.1)$$

mit  $a = 0.40783$  nm als Gitterkonstante [56] und hkl als Millersche Indizes der entsprechenden Netzebenen. Die anschließenden Beugungs-Aufnahmen der Dentinkristallite werden bei der gleichen Kameralängeneinstellung, wie sie bei dem Gold-Standard eingestellt war, erstellt.

Nach der Bestimmung der Beugungskonstante aus dem Gold-Standard werden die Radien der Debye-Scherrer-Ringe der Dentinkristallite ausgemessen und mit Hilfe der Gleichung (3.35) die Netzebenenabstände bestimmt. Diese ermittelten Werte werden anschließend mit den  $d$ -Werten aus der



**Abbildung 5.2:** Vergleich der Netzebenenabstände  $d$  aus der Röntgenbeugungs-Kartei ASTM9-432 mit den ermittelten  $d$ -Werten aus zero-loss gefilterten ESD-Aufnahmen im Dentin

Röntgenbeugungs-Kartei ASTM9-432 (1967) verglichen. Aus diesem Vergleich können die Dentinkristallite eindeutig als hexagonales Mineral Hydroxylapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  charakterisiert werden [3, 14, 48, 49] (Abb. 5.2).

Die Kristallite des Dentins zeigen in jedem Stadium der Mineralisation die Kristallstruktur des Hydroxylapatits auf (Abb. 5.3), wobei im Primärstadium einige Debye-Scherrer-Ringe aufgrund ihrer geringen Intensität mit dem Auge nicht mehr wahrnehmbar sind. Sie können aber mittels line-scan Aufnahmen und weiterer Verarbeitung durch entsprechende Software mit exponentiellem Untergrundabzug, sogenanntes „edge-stripping“, erkannt werden. Diese geringe Intensität der betreffenden Beugungsringe dürfte an der geringen Anzahl der Bragg-Reflexe der Kristallite an der Mineralisationsfront liegen [49]. Die zusätzliche diffuse Ausbildung der Debye-Scherrer-Ringe in diesem Bereich beruht auf Überlagerung der diffusen Beugungsringe des Einbettungsharzes mit denen der Kristallite (Abb. 5.3).

Da die feinkristallinen Apatit-Kristallite ( $\varnothing \simeq 1 - 3 \text{ nm}$ ) im Dentin statistisch verteilt sind [49], können zur Untersuchung der Debye-Scherrer-Ringe line-scan Diagramme benutzt werden (Kap. 3.3) und auf Grund der kinematischen Beugungstheorie untereinander ins Verhältnis gesetzt werden (Kap. 3.3.3).

**Abbildung 5.3:** Vergleich zero-loss gefilterter ESD-Aufnahmen im Dentin:  
a) nur die Spurr-Matrix, b) direkt an der Prädentin/Dentin-Grenze und c) im reifen Dentin

### 5.3 Allgemeine Dentinogenese

Die Mineralisierung des Dentins beginnt direkt an der Prädentin/Dentin-Grenze, wahrscheinlich nach einer enzymatischen Stimulation. Hierbei wirken vor allem die alkalische Phosphatase [8, 13, 14, 72] und/oder die saure Proteinase Kathepsin D [39] als Enzyme. Die alkalische Phosphatase spaltet vor allem die anorganischen Phosphat-Gruppen von den Phosphatestern ab, die mit den Kalzium-Ionen die Apatit-Keime an den „aktiven Zentren“ der Matrixmoleküle bilden [20, 21, 22, 23, 25, 47, 48, 49, 71].

In der initialen Phase der Dentinogenese entsteht das Manteldentin. Es wird gebildet während sich die Basalmembran verdichtet und die Odontoblasten ihre terminale Differenzierung durchlaufen [66]. Es kann daher als Produkt unreifer, noch nicht voll ausdifferenzierter Odontoblasten angesehen werden [45]. Das Manteldentin hat eine Schichtdicke von 10 bis 30  $\mu\text{m}$  [66] und ist parallel zur Schmelz/Dentin-Grenze angeordnet.

Nach dem Ende der Mineralisation des Manteldentins wird die Hauptmasse des Dentins, das zirkumpulpale Dentin, gebildet. Seine Mineralisation wird durch nichtkollagene Makromoleküle, die z. T. an der Oberfläche der Kollagenfibrillen fest gebunden sind, induziert. Diese Makromoleküle (Glykoproteine, Glykosaminoglykane, Phosphoproteine, etc.) mit ihren stark negativ geladenen Gruppen kommen vermehrt an der Prädentin/Dentin-Grenze vor [40, 69]. Gebundene Phosphoproteine unterstützen die Mineralisierung von Apatit [16, 41], hingegen lösliche, mobile Phosphoproteine behindern in vitro die Kalzium-Phosphat-Bildung [15].

Im Ganzen sieht man eine schichtweise Veränderung des Prädentins mit einer Zunahme der Dichte der organischen Substanz, der Makromoleküle zur Prädentin/Dentin-Grenze hin [2]. Nach der Einleitung der Mineralisation durch die an der Oberfläche der Kollagenfibrillen gebundenen Makromoleküle verläuft die Mineralisation in dem inneren Bereich der Kollagenfibrille weiter [22, 23].

Dieses bedeutet, daß die Mineralisation erst einsetzt, wenn das Prädentin einen bestimmten Reifungsgrad erreicht hat. Diese hieraus resultierende Mineralisationsfront verläuft relativ scharf begrenzt an der Prädentin/Dentin-Grenze (Abb. 5.4). Das Prädentin weist eine Ausdehnung von etwa 15  $\mu\text{m}$  bei Ratten-Incisoren auf, wobei diese Ausdehnung den Abstand zwischen der Mineralisationsfront und der distal verlaufenden Odontoblastenreihe beschreibt.

Bei der Mineralkeimbildung im Inneren der Kollagenfibrillen werden zuerst vermehrt Kalzium- und Phosphatgruppen an sogenannte „aktive Zentren“, polare Gruppen am Kollagen-Molekül der Kollagen-Mikrofibrillen innerhalb der dicken Fibrillen, z. B. Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin, Arginin, Histidin, etc., gebunden [20, 21, 22, 23, 25, 47, 48, 49, 71]. Diese bilden primäre Kristallit-Keime, die anschließend zu stabilen Punkt- bzw. Insel-

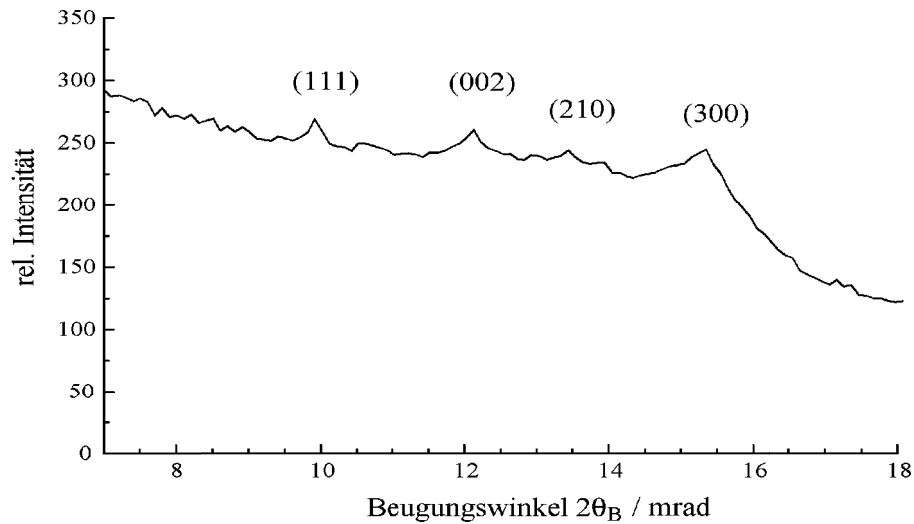
**Abbildung 5.4:** Übersicht: Relativ scharf begrenzte Mineralisationsfront an der **Prädentin/Dentin**-Grenze; geschlossene Kreise beschreiben in Näherung Querschnitte der Odontoblastenfortsätze.

gebildet, mit einem etwa 1 bis 2 nm betragenden Durchmesser und einem mittleren Abstand von etwa 3.6 bis 6.5 nm in longitudinaler Richtung entlang der Kollagenmikrofibrille [1, 48, 49], heranwachsen.

Hierbei bilden sich aus den Punkten entlang der Mikrofibrillen primär Mineralketten. Diese Mineralpunktketten wachsen sehr schnell in longitudinaler Richtung zusammen, so daß die einzelnen Punkte nicht mehr zu erkennen sind [1, 19, 20, 21, 25, 48, 49]. Diese so an den Mikrofibrillen gebildeten nadelförmigen Kristallite liegen dabei annähernd parallel zueinander angeordnet. Die übergeordneten dicken Kollagenfibrillen sind aber insgesamt nicht parallel orientiert, sondern statistisch in der Dentinmatrix verteilt (Abb. 5.4). Diese statistische Verteilung erlaubt es, line-scan Untersuchungen von Debye-Scherrer-Ringen in dem Dentin vorzunehmen [1, 47, 48, 49].

## 5.4 Reifung der Dentinkristallite

Bei den Untersuchungen der zero-loss gefilterten Elektronen-Beugungs-Diagramme werden die charakteristischen Beugungs-Reflexe (111) mit dem Netzebenenabstand  $d = 0.388$  nm, (002) mit  $d = 0.344$  nm, (210) mit  $d = 0.308$  nm sowie (300) mit  $d = 0.272$  nm betrachtet (Abb. 5.5). In dem



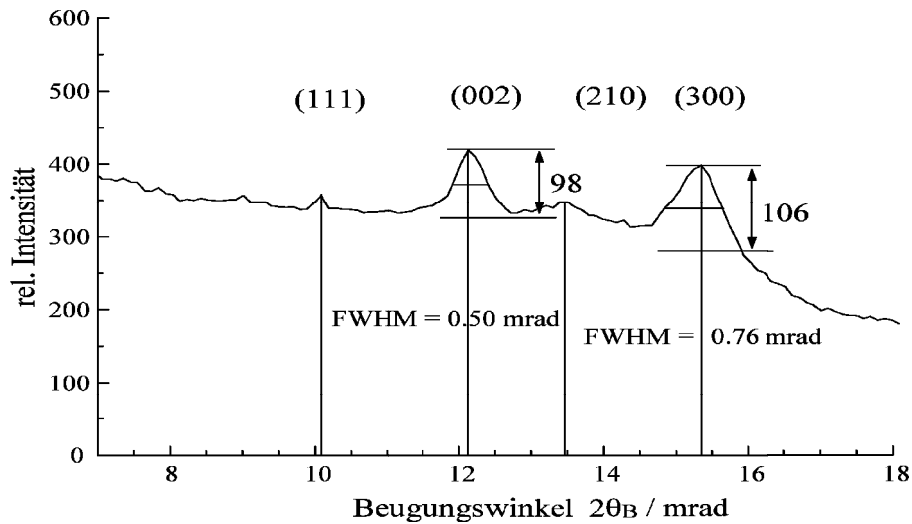
**Abbildung 5.5:** Line-scan Diagramm eines zero-loss gefilterten Beugungsbildes mit den Beugungs-Reflexen (111), (002), (210) und (300) an der Mineralisierungsfront.

(300)-Reflex sind noch weitere unaufgelöste Reflexe, nach Elliott und Meckie [11]: der (141)- und (122)-Reflex; nach Young [73]: der (211)- und (202)-Reflex; und nach Landis [36]: der (211)- und (112)-Reflex, enthalten.

Im folgenden werden die netto Signal-Intensitäten der Debye-Scherrer-Ringe dieser vier charakteristischen Reflexe miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die netto Signal-Intensitäten wurden, wie in der Abbildung 5.6 dargestellt, bestimmt. Zum einen werden diese Intensitätsverhältnisse aus zero-loss gefilterten ESD-Diagrammen des Anfangs- und des reifen Stadiums der Mineralisation verglichen, um strukturelle Unterschiede zwischen diesen Stadien der Mineralisation festzustellen. Desweiteren werden die Intensitätsverhältnisse bezüglich des Abstandes  $l$  zur Mineralisationsfront genauer betrachtet. Hierzu wurden ab der Mineralisationsfront etwa alle 1.5 bis 2  $\mu\text{m}$  line-scan Diagramme über einen Bereich von 40 bis 50  $\mu\text{m}$  im Dentin aufgenommen.

#### 5.4.1 Primäres Kristallitwachstum

Direkt an der Mineralisationsfront kann nur der (111)-Reflex mit einer line-scan Aufnahme deutlich gesehen werden (Abb. 5.7a), die anderen drei Reflexe müssen mit dem sogenannten „edge-stripping“ sichtbar gemacht werden. Dieser (111)-Reflex nimmt aber mit zunehmender Mineralisierung des Dentins

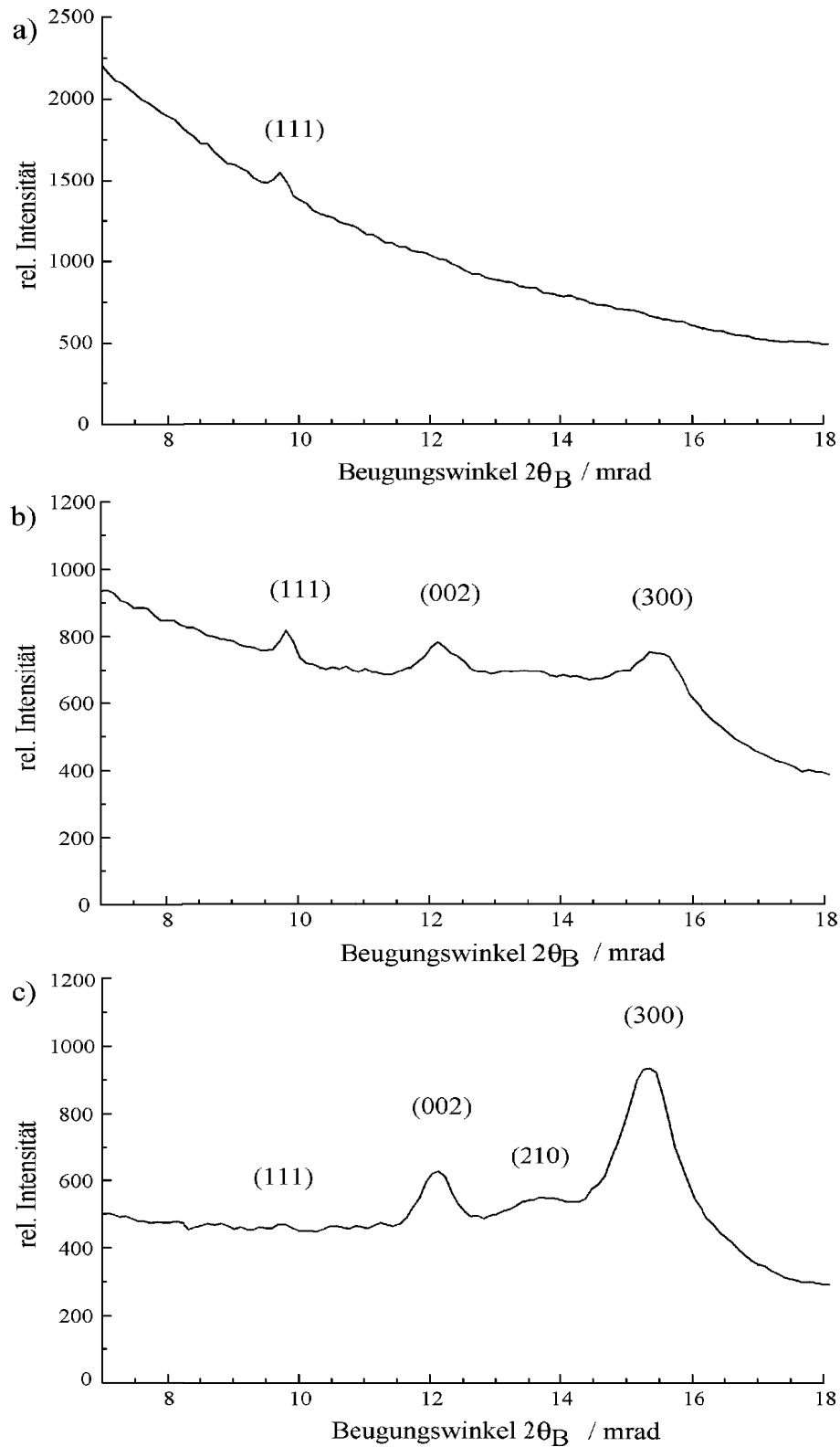


**Abbildung 5.6:** Bestimmung der netto Signal-Intensitäten der charakteristischen Debye-Scherrer-Ringe.

an Intensität ab (Abb. 5.7b, c, Abb. 5.8) und ist im reifen Stadium fast nur noch mit Hilfe des „edge-stripping“ zu sehen.

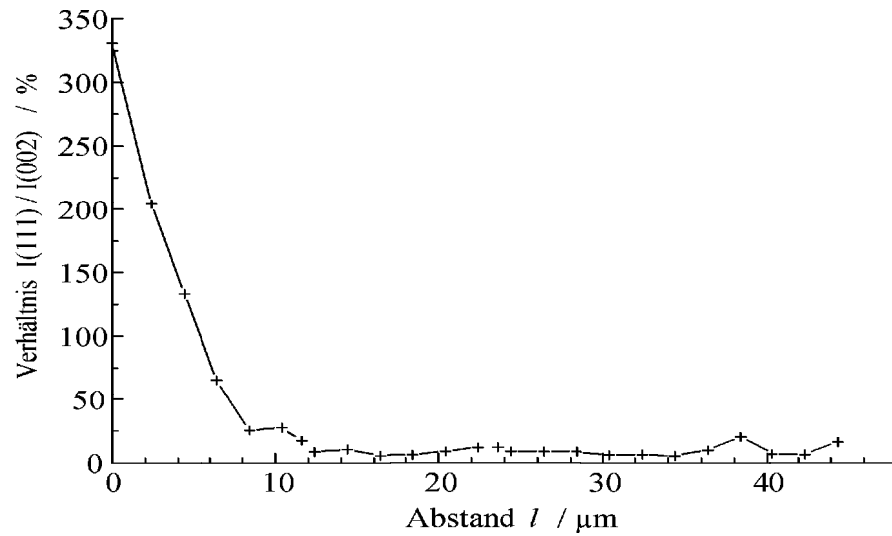
Dieses Maximum an der Mineralisationsfront des (111)-Reflexes deutet auf eine Kristallitbildung hin, bei der aus primären Kristallit-Keimen an den „aktiven Zentren“ der kollagen Mikrofibrillen stabile Punkt- und Inselgebilde heranwachsen. Dabei bilden sich längere Punktketten in longitudinaler Richtung entlang der Mikrofibrillen (Kap. 5.3) [47, 71]. Diese Punktketten wachsen schnell zu größeren Kristalliten zusammen, was durch die stetige Abnahme der Intensität des Beugungs-Reflexes schon zu Beginn der Mineralisation verdeutlicht wird (Abb. 5.7, Abb. 5.8).

Der Vergleich des Intensitätsverhältnisses des (002)- mit dem (300)-Reflex (mit den zwei unaufgelösten Reflexen) zeigt zu Beginn der Mineralisation ein Maximum bzgl. des (002)-Reflexes (Abb. 5.7b, Abb. 5.10, Abb. 5.11). Dieses bedeutet, daß sich aus den Punktketten entlang der Mikrofibrillen primär nadelförmige Kristallite entlang der c-Achse des Apatits ausbilden. Erst sekundär wächst das Apatit, bei weiterer Kristallitreifung, hauptsächlich in lateraler Richtung zu blättchen- bis rippenförmigen Kristallite zusammen [1, 47, 48]. Diese erst sekundäre Mineralisation in lateraler Richtung wird durch das Maximum zu Beginn und der anschließenden Abnahme des Intensitätsverhältnisses bzgl. des (002)-Reflexes zum reifen Stadium der Mineralisation hin veranschaulicht (Abb. 5.7, Abb. 5.10, Abb. 5.11).



**Abbildung 5.7:** Line-scan Diagramme zero-loss gefilterter ESD-Aufnahmen  
a) an der Mineralisationsfront, im b) Anfangs und c) reifen Stadium der Dentin-Mineralisation.



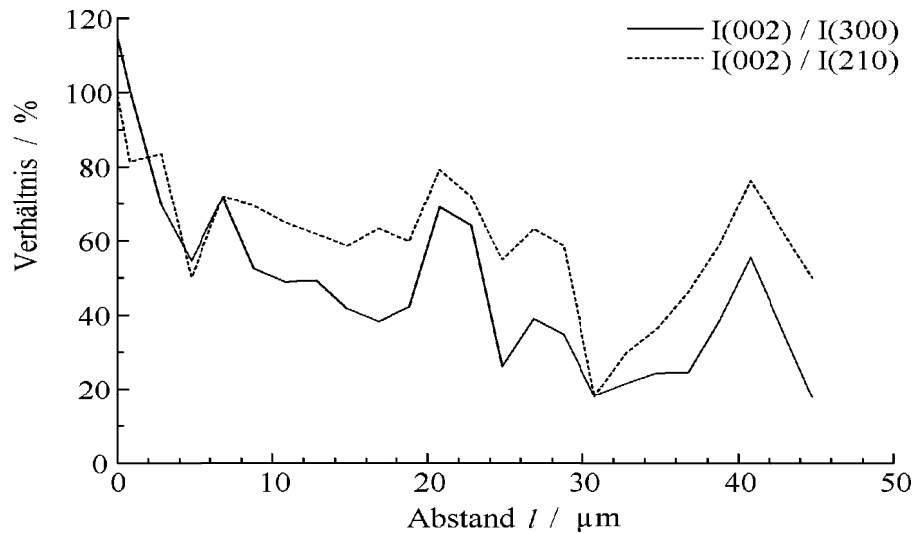


**Abbildung 5.8:** Verhältnis der netto Signal-Intensitäten des (111)- zum (002)-Reflex in Abhängigkeit vom Abstand  $l$  zur Mineralisationsfront.

Das Intensitätsverhältnis des (002)- zum (210)-Reflex zeigt ein ähnliches Verhalten. Auch hier liegt ein Maximum zu Beginn der Kristallitbildung vor und nimmt mit fortschreitender Kristallitreifung ab (Abb. 5.7, Abb. 5.9). Dieses Verhalten unterstützt die Aussage der primären nadel- und erst sekundären rippen- bis blättchenförmigen Kristallitbildung. Im Gegensatz zum (300)-Reflex ist die Anzahl der Bragg-Reflexe des (210)- gegenüber dem (002)-Reflex während der ganzen Mineralisation geringer, was durch eine generell niedrigere Intensität der entsprechenden Debye-Scherrer-Ringe belegt wird.

#### 5.4.2 Wachstumslinien

Die Bildung des zirkumpulpalen Dentins ist kein kontinuierlicher, sondern ein rhythmischer Prozeß, mit wechselnden Perioden der aktiven Sekretion durch die Odontoblasten, mit der Mineralisation des Prädentins, und den Ruheperioden [66]. Um genauere Aussagen über eventuelle Strukturveränderungen während der rhythmischen Mineralisation festzustellen, wurden line-scan Untersuchungen auf 40 bis 50  $\mu\text{m}$  breite Dentinbereiche, einschließlich der Mineralisationsfront, durchgeführt. Es wurden etwa alle 1.5 bis 2  $\mu\text{m}$  line-scan Spektren aufgenommen und die netto Signal-Intensitätsverhältnisse des (002)- zum (300)- und des (002)- zum (210)-Reflex gegen den Abstand  $l$  zur

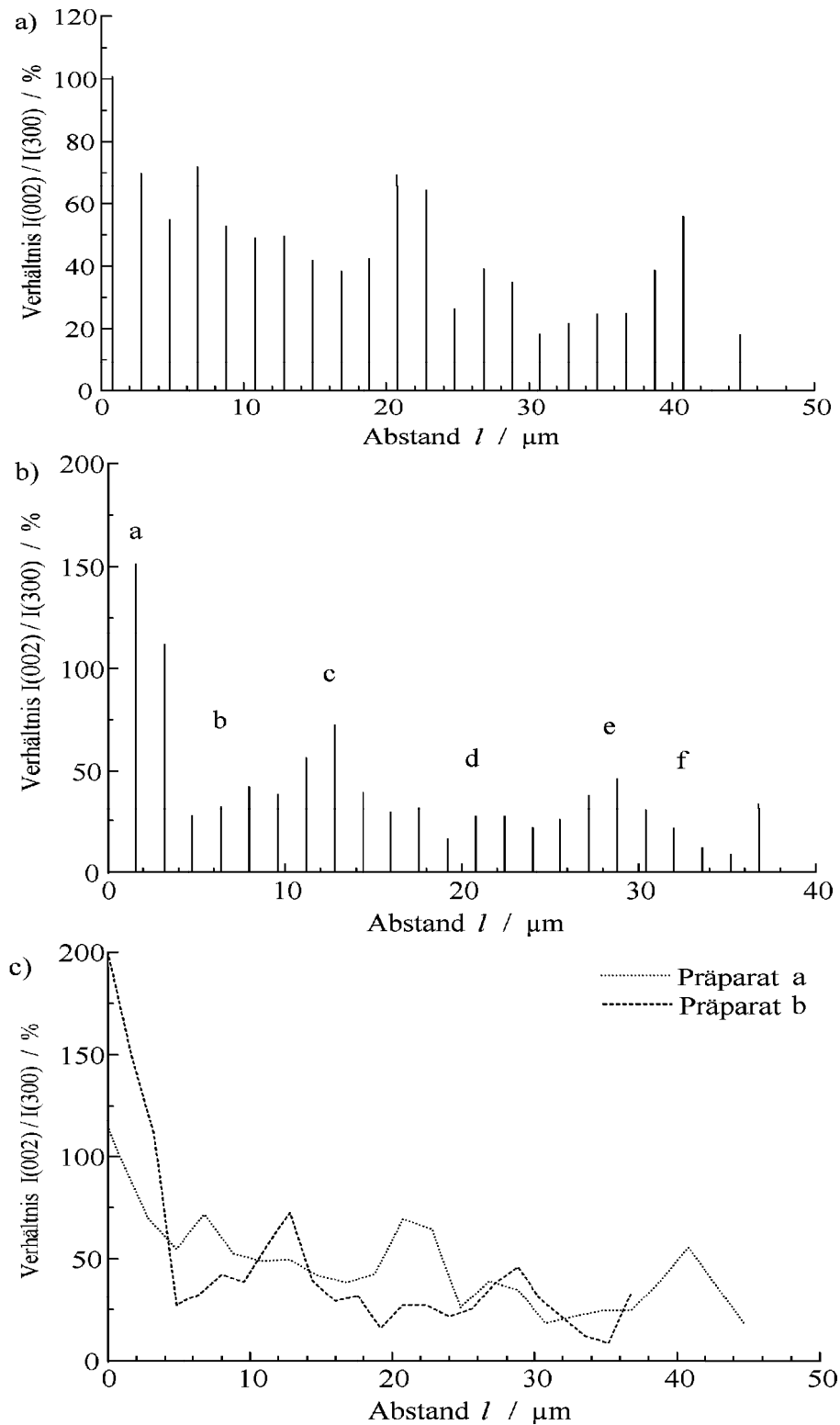


**Abbildung 5.9:** Vergleich der netto Signal-Intensitätsverhältnisse (002)- zum (300)- und (002)- zum (210)-Reflex in Abhängigkeit des Abstandes  $l$  zur Mineralisationsfront

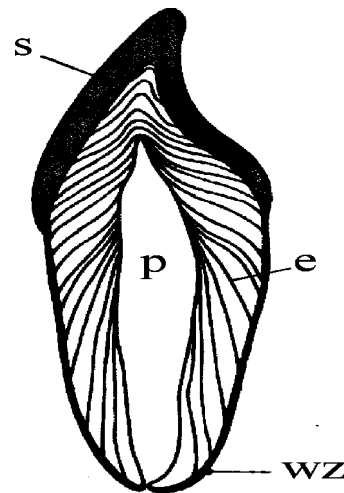
Mineralisationsfront aufgetragen (Abb. 5.9, Abb. 5.11, Abb. 5.13, Abb. 5.14). Diese Untersuchungen zeigten einen rhythmischen Verlauf der Intensitätsverhältnisse (Abb. 5.11) [1]. Nach dem Abfall des Intensitätsverhältnisses zu Beginn der Mineralisation wächst etwa 6 bis 12  $\mu\text{m}$  hinter der Mineralisationsfront das Verhältnis dieser Reflexe spontan an und fällt wieder ab. Dieses Verhalten wiederholt sich kontinuierlich etwa alle 8 bis 16  $\mu\text{m}$  im Verlauf der Dentinmineralisierung (Abb. 5.10, Abb. 5.11) [1, 49]. Die beiden Intensitätsverhältnisse bezüglich des (002)-Reflexes zeigten den gleichen Verlauf während der Mineralisation (Abb. 5.9, Abb. 5.10).

Diese Änderung der Intensitätsverhältnisse bedeutet Änderungen der Strukturverhältnisse der Dentinkristallite während der Mineralisation. Dieses weist auf periodische Wachstumsprozesse des Dentins hin, in denen sich die Dentin-Kristallite an der aktuellen Mineralisationsfront zuerst bevorzugt in  $c$ -Achsen-Richtung und erst sekundär bevorzugt in lateralen Richtungen ausmineralisieren [1]. Diese strukturellen Vorgänge sind mit Wachstumslinien in Hinblick auf ihre Abstände identisch, die als frühere Mineralisationsfronten identifiziert werden können.

**Abbildung 5.10:** Zero-loss gefilterte ESD–Aufnahmen im Verlauf der Kristallitreifung. Die Nummerierung entspricht dem jeweiligen Reifungsprozeß, wie er in (Abb. 5.11b) dargestellt wird.



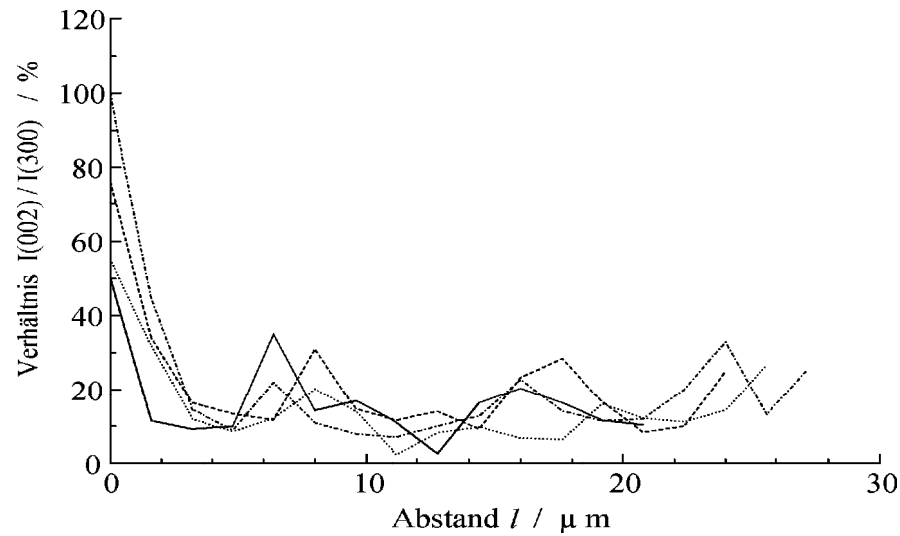
**Abbildung 5.11:** Netto Signal-Intensitätsverhältnisse der Reflexe (002) zu (300) in Abhängigkeit vom Abstand  $l$  zur Mineralisationsfront in zwei verschiedenen Präparaten a) und b). Gegenüberstellung der Intensitätsverhältnisse von a) und b) in c).



**Abbildung 5.12:** Schematischer Verlauf der Wachstumslinien (e), von-Ebner-Linien, im Dentin eines Incisoren [30] (s: Schmelz, p: Pulpa-kammer, wz: Wurzelzement).

Kawasaki [31] beschreibt Wachstumslinien im Dentin, auch von-Ebner-Linien genannt [30, 42, 64, 65], als eine periodische Änderung der Orientierung der Kollagenfibrillen während der Dentinbildung. Diese von-Ebner-Linien spiegeln die jeweilige Ausbildungsphase des Dentins wieder und haben einen mittleren lateralen Abstand bei Ratten-Incisoren von etwa  $16\text{ }\mu\text{m}$  [62, 64, 65] (Abb. 5.12), wobei die Abstände starken Schwankungen unterliegen, die bis zu 50% betragen [30] (Abb. 5.11). Diese Schwankungen der Abstände der Wachstumslinien ergeben sich aus der topographischen Lage der versorgenden Odontoblasten im Kronen- oder Wurzelbereich [30] sowie der labialen und der lingualen Seite des Zahnes [43, 60]. Hoffman und Schour [18] haben Abstands-Unterschiede in dem täglichen Mineralisationswachstum von 1 bis  $16\text{ }\mu\text{m}$  pro Tag in Abhängigkeit des Ortes gefunden. Die Mineralisation ist ebenso von der Sekretionsaktivität zu Beginn der Mineralisation, den Variationen der Sekretionsaktivität während des Lebenszyklus der Zellen und der Mineralisationsablagerungsrate in die Dentinmatrix abhängig [31].

Diese Parameter führen dazu, daß selbst innerhalb eines kleinen Bereiches der Abstand zwischen zwei von-Ebner-Linien stark variiert. In der Abbildung 5.13 sind vier line-scan Analysen eines knapp  $30\text{ }\mu\text{m}$  breiten Dentinbereiches dargestellt. Die jeweiligen lateralen Abstände der annähernd gerad-

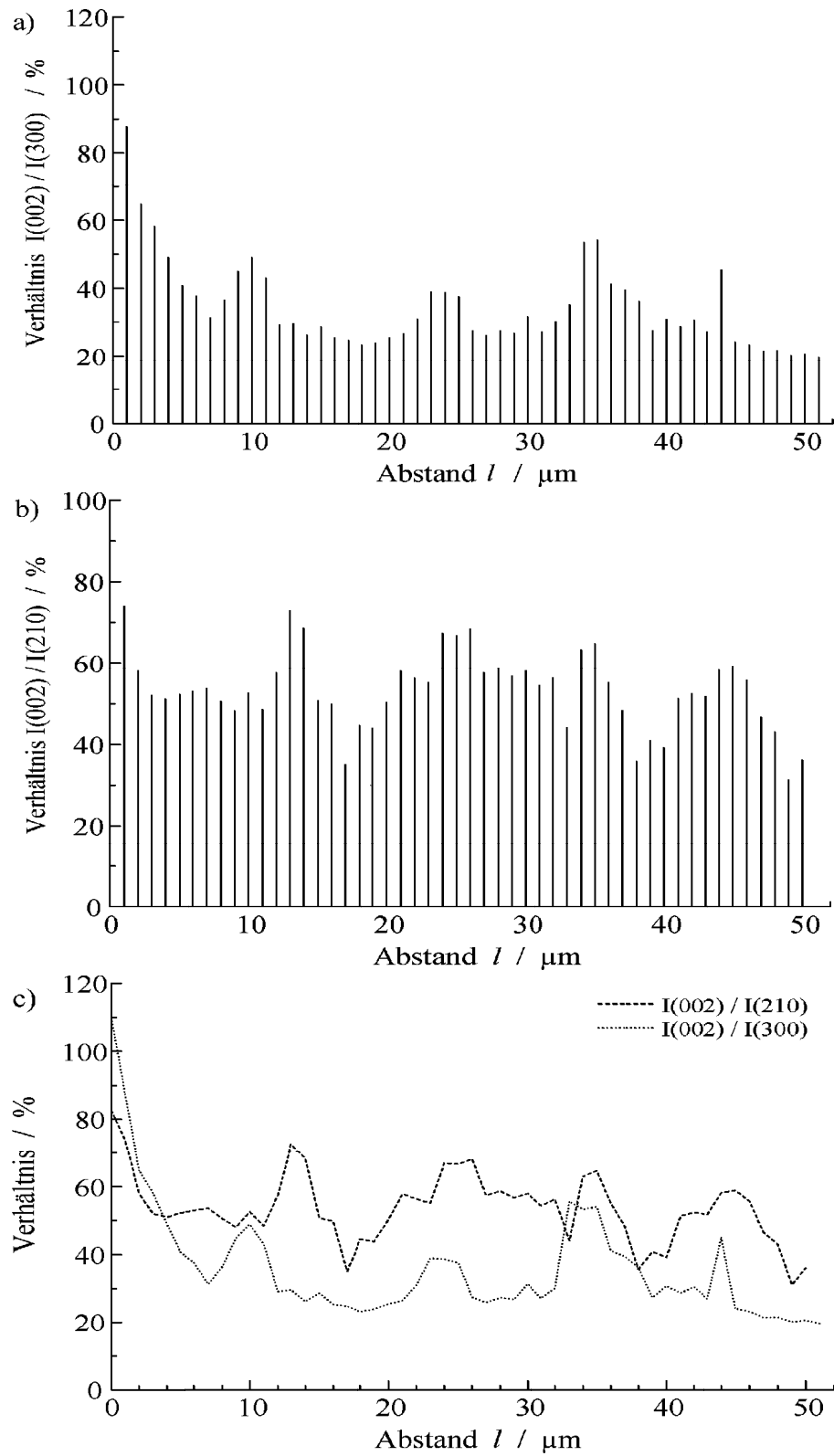


**Abbildung 5.13:** Vergleich von vier line-scan Analysen bzgl. der Reflexe (002) und (300) mit relativen lateralen Abständen von etwa 3 bis  $3.5 \mu\text{m}$ .

linigen im Abstand von  $1.5$  bis  $2 \mu\text{m}$  aufgenommenen line-scan Diagramme betragen dabei etwa  $3$  bis  $3.5 \mu\text{m}$ . Bei jeder Versuchsreihe treten die strukturellen Wachstumslinien auf und zeigen Abweichungen in den Abständen zwischen den Wachstumslinien. Diese Abweichungen zeigen, daß die von-Ebner-Linien nicht völlig parallel zu der Prädentin/Dentin-Grenze verlaufen. Zur genaueren Analyse müssen noch vermehrt Untersuchungen durchgeführt werden.

Im Folgenden werden die bisherigen Ergebnisse in ihrer Gesamtheit in einem Mittelwertdiagramm dargestellt. Hierzu werden aus 50 Einzelmessungen die mittleren Abstände zwischen zwei Wachstumslinien bestimmt und die line-scan Reihen dementsprechend einander angeglichen. Anschließend werden die arithmetischen Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse bezüglich des ermittelten Abstandes  $l$  zur Mineralisationsfront gebildet. Hierbei ergab sich ein mittlerer Abstand zwischen zwei Wachstumslinien von  $11.5 \pm 3.5 \mu\text{m}$  (Abb. 5.14).

Die Mittelwertdiagramme zeigen deutlich ein Maximum bezüglich des (002)-Reflexes an der aktuellen Mineralisationsfront. Ebenfalls lassen sich die früheren Mineralisationsfronten in Abständen von  $9$  bis  $13 \mu\text{m}$  deutlich wiederfinden, wobei sie allerdings nicht die Intensität der aktuellen Mineralisationsfront erreichen (Abb. 5.14).



**Abbildung 5.14:** Mittelwert aus 50 line-scan Analysen: Netto Signal-Intensitätsverhältnis a) (002)- zum (300)-Reflex, b) (002)- zum (210)-Reflex und c) (002)- zum (300)- sowie (002)- zum (210)-Reflex bzgl. des Abstandes  $l$  zur Mineralisationsfront.

Desweiteren sind die Verläufe der Intensitätsverhältnisse (002)– zum (300)– und (002)– zum (210)–Reflex sehr ähnlich, wodurch die morphologischen ESI–Aufnahmen (Abb. (5.15) des primären nadelförmigen und erst sekundären rippen– bis blättchenförmigen Wachstums der Kristallite belegt werden [1, 47, 48, 49]. Außerdem wird die Hypothese über die strukturellen Veränderungen zu bestimmten Zeitpunkten der Mineralisation durch die Mittelwertdiagramme unterstützt (Abb. 5.14).

**Abbildung 5.15:** Ausbildung primärer nadelförmiger Apatit–Kristallite (Pfeile).

## 5.5 Strahlenschädigung

Organische Substanzen erfahren eine Schädigung in ihrer Struktur, wenn sie ionisierender Strahlung ausgesetzt werden. Diese Strahlenschädigung wird hauptsächlich durch die unelastischen Streuprozesse (Kap. 3.2), verursacht. Dieses führt neben einer Aufheizung der Probe auch zu einer Aufspaltung chemischer Bindungen [33, 56].

Die Strahlenschädigung ist abhängig von der Energie, die auf das Präparat übertragen wird, bzw. von der Ladungsdichte  $q = jt$ , mit  $j$  als Strahlstromdichte pro Flächeneinheit und  $t$  als Bestrahlungszeit. Bei Polymeren mit relativ hohem Molekulargewicht, wie z. B. Epon oder andere Einbettungsmittel, kann der Massenverlust durch einen exponentiellen Abfall, bis zu einem Grenzwert, beschrieben werden. Die Strahlenschädigung hängt auch von der

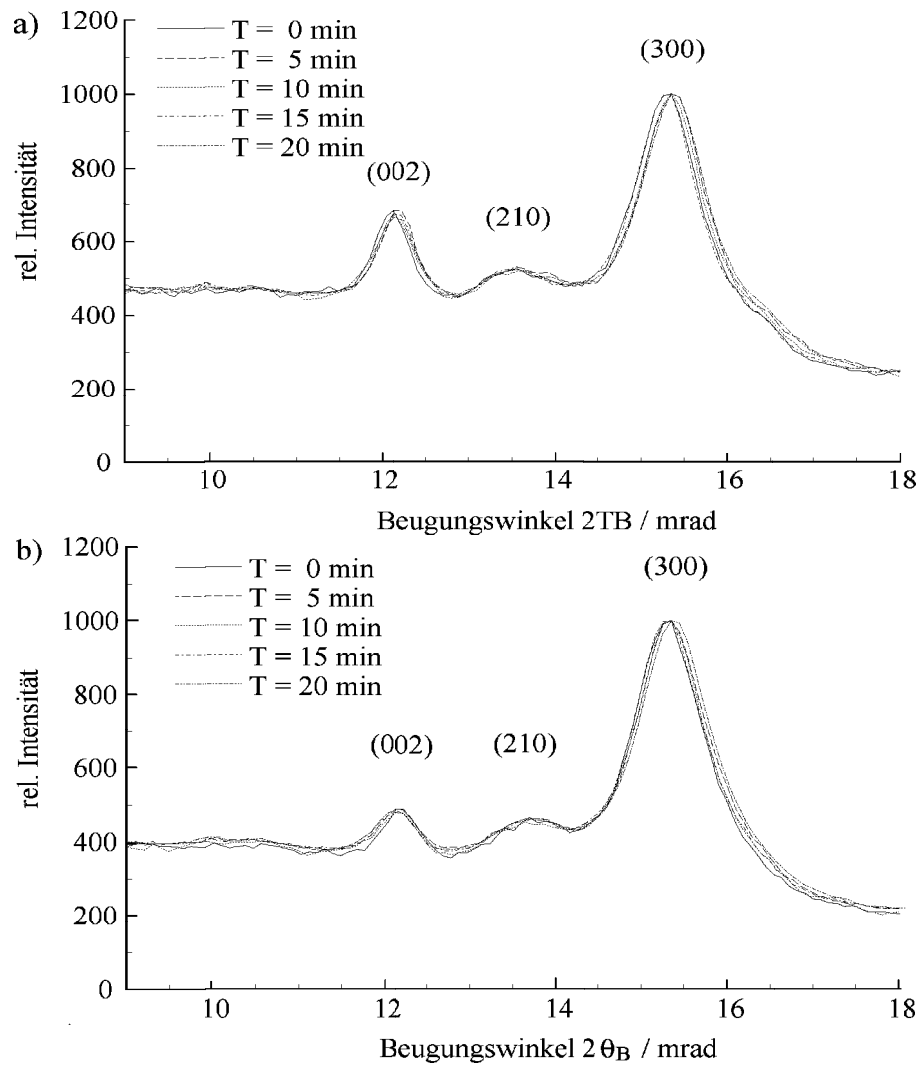


jeweiligen Probe selbst ab, z. B. ist ein aromatischer Kohlenwasserstoff weniger empfindlich als eine vergleichbare Substanz [32, 33].

Strahlenschädigungen können mit unterschiedlichen Methoden quantitativ analysiert werden, wie z. B. durch direkte Wägung vor und nach der Bestrahlung, durch Vergleich des Signal–Untergrund Verhältnisses bei der Elektronen–Energie–Verlust–Spektroskopie (EELS) sowie durch Veränderungen der Intensitäten von Debye–Scherrer–Ringen im Verlauf der Bestrahlung [33, 49, 56].

Zur Untersuchung, in wie weit Strahlenschädigung bei der strukturellen Analyse des Apatits eine Rolle spielt, wurden zwei Beugungsdiagramme an verschiedenen Stadien der Mineralisation fünfmal unter den gleichen Bedingungen in zeitlichen Abständen von etwa fünf Minuten aufgenommen (Abb. 5.16). Bei allen Untersuchungen konnten keine merklichen Unterschiede in den Intensitätsverhältnissen der Apatit–Beugungsdiagramme festgestellt werden.

Da keine Veränderungen der Intensitäten in den Apatit–Beugungsdiagramme während der Analyse zu erkennen waren (Abb. 5.16), konnten die Auswirkungen der Strahlenschädigung in dieser Arbeit vernachlässigt werden. Um die Strahlenschädigung insgesamt gering zu halten; wurde mit möglichst geringen Strahlstromdichten untersucht; hierdurch wurden unter anderem die Massenverluste klein gehalten. Ebenso wurde mit einer Objektraumkühlung gearbeitet, um die Kontaminationen zu unterdrücken.



**Abbildung 5.16:** Fünf line-scan Beugungsdiagramme in zeitlichen Abständen von etwa fünf Minuten, a) auf einer und b) zwischen zwei Wachstumslinien.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Mineralisierung des dentalen Hartgewebes Dentin strukturell und morphologisch mit dem energiefilternden Transmissionselektronenmikroskop EM 902 der Firma Zeiss untersucht. Mit Hilfe der zero-loss Filterung konnten im elektronenspektroskopischen Beugungs- (ESD) und im Abbildungs-Modus (ESI), auf Grund des gesteigerten Kontrastes, Vorgänge der Hartgewebsbildung quantitativ untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, daß die Kristallit-Keime, die an den „aktiven Zentren“ (z. B. polare, geladene Gruppen der Kollagenmikrofibrillen) gebildet werden, zu stabilen Punkt- und Inselgebilden heranwachsen und somit Punktketten entlang der Kollagenmikrofibrille bilden. Diese Punktketten wachsen wiederum primär in longitudinaler Richtung zusammen, so daß einzelne Punkte nicht mehr zu erkennen sind, und bilden nadelförmige Apatit-Kristallite. Erst sekundär wachsen diese Apatit-Kristallite hauptsächlich in lateraler Richtung zu rippen- bis plättchenförmigen Kristalliten zusammen.

Im Verlauf der weiteren Mineralisation konnte ein rhythmischer Prozeß festgestellt werden. Hierbei wechseln sich Perioden mit, entlang der c-Achse des Apatits ausgerichteten, nadelförmigen Kristalliten mit überwiegend rippen- bis blättchenförmigen Apatit-Kristalliten ab. Perioden mit der nadelförmigen Kristallitbildung konnten als von-Ebner-Linien identifiziert werden. Diese Wachstumslinien beschreiben frühere Mineralisationsfronten, und die Bereiche zwischen diesen Fronten können als Reifungsphasen des Dentins bezeichnet werden. Generell konnte festgestellt werden, daß in der aktuellen Mineralisationsfront die nadelförmige Ausbildung der Kristallite gegenüber der lateralen, rippen- bis blättchenförmigen am größten ist. Dieses Verhalten wird durch die Intensitäten der charakteristischen Beugungsreflexe (002) und (300) bzw. (210) verdeutlicht.

Um genauere Aussagen über den Abstand zwischen zwei von-Ebner-Linien machen zu können, muß bei jeder line-scan Analyse der entsprechende lokale morphologische Bereich im Dentin bestimmt werden. Hieraus ergibt sich, daß der Zusammenhang zwischen den von-Ebner-Linien und den strukturellen Veränderungen der Mineralisierung in weiteren Arbeiten noch genauer untersucht werden muß.

Abschließend kann gesagt werden, daß mit Hilfe der elektronenspektroskopischen Beugung der Ablauf der dentalen Hartgewebsbildung rein strukturell beschrieben werden kann. Es konnte die Ausbildung von primären Punktketten über nadelförmige Kristallite bis zu den reifen rippen- bis blättchenförmigen Apatit-Kristalliten gefunden werden. Ebenso konnte der rhythmische Verlauf der Dentinmineralisierung, die zu bestimmten Zeitpunkten periodische Veränderungen aufweist, strukturell über die Intensitätsverhältnisse charakteristischer Beugungsreflexe erklärt werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] Arnold, S., Plate, U., Reimer, L. Höhling, H. J.: Quantitative line-scan Analyse der Dentinmineralisierung von Ratten-Inzisivzähnen in der EFTEM. Eur. J. Cell Biol. **61** (Suppl. 39), 105 (1993)
- [2] Baume, L. J.: The biology of pulp and dentine. In Myers, H. M.: Monogr. Oral Sci., Vol. **VIII**, Karger, Basel (1980)
- [3] Barckhaus, R. H., Höhling, H. J., Fromm, I., Hirsch, P., Reimer, L.: Electron spectroscopic diffraction and imaging of the early and mature stages of calcium phosphate formation in the epiphyseal growth plate. J. Micr. **162**, 155-169 (1991)
- [4] Blackman, M.: On the intensities of electron diffraction rings. Proc. Roy. Soc. **A 173**, 68-82 (1939)
- [5] Boersch, H.: Gegenfilter für Elektronenbeugung und Elektronenmikroskopie. Z. Phys. **134**, 156-164 (1953)
- [6] Castaing, R., Henry, L.: Filtrage magnetique des vitesses en microscopie électronique. Comp. rend. Acad. Sci. Paris **B 255**, 76-78 (1962)
- [7] Cromer, D. T., Waber, J. T.: Scattering factors computed from relativistic Dirac-Slater wave functions. Acta. Cryst. **18**, 104-109 (1965)
- [8] de Bernhard, B.: Glycoprotein in local mechanism of calcification. Clin. Orthop. Res. **162**, 233-244 (1982)
- [9] Egerton, R. F.: Measurements of inelastic/elastic scattering ratio for fast electrons and its use in the study of radiation damage. Phys. stat. sol(a) **37**, 663-668 (1976)
- [10] Egerton, R. F.: Electron energie-loss spectroscopy in Electron Microscop. Plenum Press, New York, London (1986)

- [11] Elliott, J. C., Mackie, P. E.: Monoclinic Hydroxyapatite. Coll. int. C.N.R.S. **230** – Physico-chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique, Paris, 69-76 (1975)
- [12] Fromm, I.: Untersuchung von Beugungsphänomenen unelastisch gestreuter Elektronen mittels eines Transmissionselektronenmikroskopes mit integriertem Energiefilter. Diplomarbeit, Münster (1988)
- [13] Fromme, H. G., Höhling, H. J., Riedel, H.: Elektronenmikroskopische Studien über die Dentinbildung. 1. Mitteilung: Lokalisation von Calcium und alkalischer Phosphatase. Dt. zahnärztl. Z. **26**, 6-13 (1971)
- [14] Fromme, H. G., Höhling, H. J., Riedel, H.: Elektronenmikroskopische Studien über die Dentinbildung. 2. Mitteilung: Autoradiographische Studien zur Funktion der Odontoblasten. Dt. zahnärztl. Z. **27**, 6-13 (1972)
- [15] Fujisawa, R., Kuboki, Y., Sasaki, S.: Effects of dentine phosphoryn on precipitation of calcium phosphate in gel in vitro. Calcif. Tissue Int. **41**, 44-47 (1987)
- [16] Glimcher, M. J.: Mechanismen of calcification: role of collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. Anat. Rec. **224**, 139-153 (1989)
- [17] Hanson, H. P., Herman, F., Lea, J. D., Skillman, S.: HFS atomic scattering factors. Acta. Cryst. **17**, 1040-1044 (1964)
- [18] Hoffman, M. M., Schour, I.: Quantitative studies in the development of the rat molar. I. The growth pattern of the primary and secondary dentin from birth to 500 days of age. Anat. Rec. **78**, 233-252 (1940)
- [19] Höhling, H. J., Schöpfer, H., Neubauer, G.: Elektronenmikroskopie und Laserbeugungs-Untersuchungen zur Charakterisierung der organischen Matrix im Speichelstein und Hartgewebe. Z. Zellforschung **108**, 415-430 (1970)
- [20] Höhling, H. J., Kreilos, R., Neubauer, G., Boyed, A.: Electron microscopy and electron microscopical measurements of collagen mineralization in hard tissue. Z. Zellforschung **122**, 36-52 (1971)

- [21] Höhling, H. J., Ashton, B. A., Köster, H. D.: Quantitative electronen-microscopic investigations of mineral nucleation in collagen. *Cell Tissue Res.* **148**, 11-26 (1974)
- [22] Höhling, H. J., Barckhaus, R. H., Krefting, E. R., Schreiber, J.: Electron mircoscopic microprobe analysis of mineralized collagen fibrils and extracollagenous regions in turkey leg tendon. *Cell Tissue Res.* **175**, 345-250 (1976)
- [23] Höhling, H. J., Althoff, J., Barckhaus, R. H., Krefting, E. R., Lissner, G., Quint, P.: Early stages of crystal nucleation in hard tissue formation. *Int. Cell Biol. 1980-1981* (ed. by H. G. Schweiger), 974-982, Springer Verlag, Berlin (1981)
- [24] Höhling, H. J., Krefting, E. R.: Cryopreparation for mircoprobe analysis of calcified tissure. *Methods of Calcified Tissue Preparation* (ed. by G. R. Dickson), Elsevier Amsterdam, New York, Oxford, 219-245 (1984)
- [25] Höhling, H. J., Barckhaus, R. H., Krefting, E. R., Althoff, J., Quint, P.: Collagen mineralization: aspects of the structural relationship between collagen and the apatitic crystallites. *Ultrastructure of Skeletal Tissue* (ed. by E. Bonucci and P. M. Motta), 41-62, Kluwer Aca. Publ., Boston, Dordrecht, London 1990
- [26] Hülk, C.: Energiefilterung der Debye-Scherrer-Ringe von polykristallinen Aufdampfschichten. Diplomarbeit, Münster (1993)
- [27] Ibers, J. A., Vainshtein, B. K.: *International Crystallographic Tables III*. Kynoch Press, Birningham (1962)
- [28] Jones, I L, Leaver, A. G.: Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. *Arch. oral Biol.* **19**, 371 (1974)
- [29] Kawasaki, K.: On the configuration of incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labelling. *J. Anat.* **119**, 61-66 (1975)
- [30] Kawasaki, K., Tanaka, S., Ishikawa, T.: On the incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labelling. *J. Anat.* **123**, 427-436 (1977)
- [31] Kawasaki, K., Tanaka, S., Ishikawa, T.: On the daily incremental lines in human dentine. *Arch. oral Biol.* **24**, 939-943 (1980)

- [32] Krefting, E. R., Lißner, G., Höhling, H. J.: Quantitative EPMA of biological tissue using mixtures of salts as standards. *Scanning Electron Micr. Vol. II*, 369-376 (1981)
- [33] Langenfeld, M.: Methoden zur Untersuchung der Strahlenschädigung organischer Substanzen in einem energiefilternden Elektronenmikroskop. Diplomarbeit, Münster (1990)
- [34] Laue, M. von: Materiewellen und ihre Interferenzen. Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig (1944)
- [35] Le Dourain, N.: *The Neural Crest*. Cambridge Univ. Press, Cambridge (1982)
- [36] Landis, W. J., Burke, G. Y., Neuringer, J. R., Paine, M. C., Nanci, A., Bai, P., Warshawsky, H.: Earliest enamel deposits of rat incisor examined by electron microscopy, electron diffraction, and electron probe microanalysis. *Anat. Rec.* **220**, 233-238 (1988)
- [37] Lenz, F.: Zur Streuung mittelschneller Elektronen in kleinste Winkel. *Z. Naturforschung* **9A**, 185-205 (1954)
- [38] Leonhardt, H.: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 416-422, 8. Auflage (1990)
- [39] Linde, A., Persliden, B.: Cathepsin D activity in isolated odontoblasts. *Calc. Tissue Res.* **23**, 33-38 (1977)
- [40] Linde, A., Bhowan, M., Butler, W. T.: Evidence that Phosphoprotein is not Covalently Bound to Collagen. *Biochem. Biophys. Acta* **667**, 341-350 (1981)
- [41] Linde, A., Lussi, A., Crenshaw, M. A.: Mineral induction by immobilized polyanionic proteins. *Calcif. Tissue Int.* **44** 286-295 (1989)
- [42] Mishima, H., Sakae, T., Kozawa, Y., Hirai, G.: Structural variation in labial dentin and lingual dentin in the rat incisor. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* **30**, 1-10 (1988)
- [43] Mishima, H., Kozawa, Y., Sakae, T.: Two patterns of calcification in rat and rabbit incisor dentin. 223-227 (1992)
- [44] Möldner, K.: Präparationsverfahren für die Transmissions-Elektronenmikroskopie. Zeiss, Oberkochen (1974)



- [45] Moss, M. L.: Studies on dentin. I. Mantle dentin. *Acta Anat.* **87**, 481 (1974)
- [46] Peachey, L. D.: Thin sections I: A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 233 (1958)
- [47] Plate, U., Höhling, H. J.: Analysis of the early formation and crystal maturation in dentine of rat incisors by ESI and ESD. *Electron Micr.*, Vol. **3** EUREM 92, Granada, Spain, 607-611 (1992)
- [48] Plate, U., Höhling, H. J., Reimer, L., Barckhaus, R. L., Wienecke, R., Wiesmann, H. P., Boyde, A.: Analysis of the calcium distribution in predentine by EELS and of the early crystal formation in dentine by ESI and ESD. *J. Micr.* **166**, 329-341 (1992)
- [49] Plate, U.: Analyse der dentalen Hartgewebsbildung mit Methoden der Energiefilternden Transmissionselektronenmikroskopie. Dissertation, Münster (1993)
- [50] Reimer, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage (1967)
- [51] Reimer, L.: Deutung der Kontrastunterschiede von amorphen und kristallinen Objekten in der Elektronenmikroskopie. *Z. angew. Phys.* **22**, 287-296 (1967)
- [52] Reimer, L., Sommer, K. H.: Messungen und Berechnungen zum elektronenmikroskopischen Streukontrast für 17-1200 keV Elektronen. *Z. Naturforschung* **23a**, 1569-1582 (1968)
- [53] Reimer, L.: Elektronenbeugung in der Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie. Münster (1983)
- [54] Reimer, L., Ross-Messemer, M.: Contrast in the electron spectroscopic imaging mode of a TEM. II. Z-ratio, structure-sensitive and phase contrast. *J. Micr.* **159**, 143-160 (1990)
- [55] Reimer, L., Fromm, I., Hirsch, P., Plate, U., Rennekamp, R.: Combination of EELS modes and electron spectroscopic imaging and diffraction in an energy-filtering electron microscope. *Ultramicroscopy* **46**, 335-347 (1992)

- [56] Reimer, L.: Transmission Electron Microscopy, Physics of Image Formation and Microanalysis, Springer Series in Optical Science Vol. 36, 3rd Edition (1993)
- [57] Reimer, L., Rennekamp, R., Ross-Messemer, M., Fromm, I., Krah, D.: Energieverlustspektroskopie und Energiefilterung in der Transmissions-elektronenmikroskopie. Münster, 2. Auflage (1993)
- [58] Rennekamp, R.: Abbildungsmoden eines Transmissionselektronenmikroskopes mit integriertem Energiefilter. Diplomarbeit, Münster (1988)
- [59] Rez, P.: Elastic scattering of electrons by atoms. Electron-Beam Interactions with solids. SEM Inc., Chicago, 43-49 (1984)
- [60] Rosenberg, G. D., Simmons, D. J.: Rhythmic dentinogenesis in the rabbit incisor: Allometric aspects. *Calcif. Tissue Int.* **32**, 45-53 (1980)
- [61] Smillie, A. C.: The chemistry of organic phase teeth. In Zipkin, I.: Biological mineralization. Wiley, New York, 139 (1973)
- [62] Schour, I., Steadman, S. R.: The growth and daily rhythm of the incisor of the rat. *Anat. Rec.* **63**, 325-332 (1935)
- [63] Schour, I., Poncher, H. G.: The rate of apposition of human enamel and dentine as measured by effects and acute fluorosis. *Amer. J. Dis. Child.* **54**, 757-776 (1937)
- [64] Schour, I., Hoffman, M. M.: Studies in tooth development I. The 16 microns calcification rhythm in the enamel and dentine from fish to man. *J. Dent. Res.* **18**, 91 (1939)
- [65] Schour, I., Hoffman, M. M.: Studies in tooth development II. The rate of apposition of enamel and dentine in man and other mammals. *J. Dent. Res.* **18**, 161-175 (1939)
- [66] Schroeder, H. E.: Orale Strukturbiologie. Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 4. Auflage (1992)
- [67] Spurr, A. R.: A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**, 31-43 (1969)

- [68] Stephenson, J. L.: Ice crystal growth during the rapid freezing of tissues. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2** (Suppl.), 45 (1956)
- [69] Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L, Martin, G.M.: Osteonectin: I. A bone specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**, 99-105 (1981)
- [70] Weinstock, M., Leblond, C. P.: Synthesis, migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radiautography after ( $H^3$ ) proline administration. *J. Cell Biol.* **60**, 92 (1974)
- [71] Wiesmann, H. P., Plate, U., Barckhaus, R. H., Höhling, H. J., Zierold, K.: Analysis of the early hard tissue formation in dentine by energy dispersive x-ray microanalysis and energy-filtering transmission electron microscopy. *Scanning Micr. Int.* **7**, 711-718 (1993)
- [72] Wuthier, R. E.: A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of cells, mitochondria and matrix vesicles. *Clin. Orthop. Res.* **169**, 219-242 (1982)
- [73] Young, R. A.: Some aspects of crystal structural modeling of biological apatites. *Coll. int. C. N. R. S.* **230** – Physico-chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique, Paris, 21-40 (1975)

Diese Arbeit wurde im Physikalischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. J. Höhling und Herrn Prof. Dr. L. Reimer danke ich für ihre interessante Aufgabenstellung, den vielen Diskussionen, Ratschlägen und Anregungen bei dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ferner allen Mitgliedern der elektronenmikroskopischen Abteilung und der Abteilung „Mikrosondenanalyse“ des Instituts für Medizinische Physik und Biophysik für ihre hilfreiche Unterstützung.

Herrn M. Silder danke ich für seine Hilfe beim Anfertigen der photographischen Abbildungen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn U. Plate für die Einführung in die Thematik, für die vielen Diskussionen und seiner tatkräftigen Unterstützung.

Außerdem danke ich vor allem meiner Frau Sabine für ihre liebevolle Unterstützung bei dieser Arbeit und meinen Eltern für ihre Unterstützung bei meinem Studium.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Münster, den