

**Quantitative energiedispersive Elektronenstrahlmikroanalyse von Herzmuskelzellen:  
Einfluss von Fehlermöglichkeiten bei Präparation, Messung und Auswertung der  
Spektren auf die Signifikanz der Messergebnisse**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Michael Schultz  
geb. am: 07.05.1967      in : Prenzlau

Gutachterin bzw. Gutachter:

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| 1. PD Dr. A. Röder         | FB Physik/Universität Halle (Saale)             |
| 2. Prof. Dr. M. Gallitelli | Medizinische Fakultät/Universität Halle (Saale) |
| 3. Dr. habil. D. Neumann   | Inst. für Pflanzenbiochemie/Halle (Saale)       |

Halle (Saale), den 15.01.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000002953**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002953>]

---

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung und Problemstellung	4
1.1	Elementaranalyse an biologischen Proben	4
1.2	Bedeutung der statistischen Signifikanz zur Beurteilung der Messergebnisse	6
1.3	Probleme bei der Bestimmung der Calciumkonzentration	7
2	Probenpräparation und Messsystem	9
2.1	Präparation von Ventrikelmyozyten und Elektrophysiologie	9
2.2	Präparation von Standards für die Mikroanalyse	9
2.3	Herstellung von Trägerfilmen	10
2.4	Kryoschneiden, Gefriertrocknung und Probenbeschichtung	11
2.5	Elektronenmikroskop CM12	13
2.6	Energiedispersiver Röntgendetektor und Analysesystem	14
2.7	Software zur Datenaufnahme und Verarbeitung	16
3	Auswertung der EDS-Spektren	17
3.1	Kalibrierung von Position und Auflösung (Resolution)	17
3.2	Digitale Filterung	18
3.3	MLSQ-Fit	21
3.3.1	Bestimmung der Wichtungsmatrix	21
3.3.2	Berücksichtigung von Detektorfunktionsschwankungen im MLSQ-Fit	22
3.4	Kontinuummethode nach Hall	22
3.4.1	Korrektur probenfremder Kontinuumanteile	23
3.4.2	$Z^2/A$ -Korrektur (Ordnungszahlkorrektur)	24
3.5	Bestimmung von Standardfaktoren	25
3.5.1	Standards mit Dextran	25
3.5.2	Standards mit Albumin	26
3.5.3	Mineralische Standards	29
3.5.4	Standardfaktoren	31
3.6	Minimal messbare Konzentration bei Punktanalyse	34
3.7	Einfacher Test zur Abschätzung der Signifikanz	34
4	Einfluss von Fehlern bei Präparation und Messung	36
4.1	Siliziumkontamination	36
4.1.1	Größe und Verteilung der Siliziumkontamination	36
4.1.2	Korrektur der Siliziumkontamination	38
4.1.3	Ursache der Siliziumkontamination	40
4.2	Masseverlust	42
4.3	Absorptionskorrektur	42
4.4	Bestimmung des Probenstroms	44
4.5	Probenorientierung/Kippwinkel und Strahldurchmesser	44
4.6	Probenbeschichtung	47
4.7	Einfluss der Energieauflösung des EDS-Detektors	48
4.8	Konzentrationseinheiten	49
4.9	Massendickeneinfluss	50
4.10	Wassergehalt	53

---

5	Fehlermöglichkeiten bei der quantitativen Auswertung der Spektren	56
5.1	Verteilung der Röntgenquanten	56
5.2	Einfluss stochastischer Schwankungen	56
5.2.1	Abhängigkeit der Analyse vom Top-Hat-Filter	59
5.2.2	Abhängigkeit der Calciumverteilung von der Höhe des Kontinuums	63
5.2.3	Abhängigkeit der Calciumverteilung von der Kaliumkonzentration	65
5.3	Einfluss der Kalibrierung	67
5.3.1	Abhängigkeit der Calciumverteilung von der FWHM des Kaliumpeaks	67
5.3.2	Abhängigkeit der Calciumverteilung von der Position des Kaliumpeaks	68
5.4	Einfluss der Profile	69
5.5	Filmkorrektur	71
5.6	Netzkorrektur	71
5.7	Einfluss der Probenzusammensetzung	72
5.8	Zählrateneffekte	73
5.9	Negative Konzentrationen	76
6	Messungen an Ventrikelmyozyten der Ratte	77
6.1	Dosisabhängigkeit der Elementkonzentrationen	78
6.2	Einfluss von Top-Hat-Filter, Siliziumkorrektur und Detektorfunktion	81
6.3	Einfluss von Überlagerungen im Messbereich	84
6.4	Einfluss der Schnittdicke	85
6.5	Einfluss der Zählrate	87
6.6	Einfluss physiologischer Parameter	89
7	Zusammenfassung und Ausblick	92
	Literatur	96
	Abbildungsverzeichnis	I
	Tabellenverzeichnis	V
	Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Formelzeichen	VII
	Mathematische Ergänzungen	VIII

## 1 Einleitung und Problemstellung

### 1.1 Elementanalyse an biologischen Proben

Bereits seit Mitte der siebziger Jahre wird die Röntgenmikroanalyse in Zusammenhang mit der hochauflösenden Elektronenmikroskopie zur Untersuchung biologischer Proben angewandt (Gupta & Hall, 1978; Hall, 1979a).

Die hohe Ortsauflösung des Elektronenmikroskops bietet die einmalige Chance, Elementverteilungen in einzelnen Zellorganellen zu bestimmen (zum Beispiel in Mitochondrien und im sarkoplasmatischen Retikulum von Muskelzellen (Jorgensen *et al.*, 1988; Miller & Tormey, 1993; Somlyo *et al.*, 1977a; Wendt-Gallitelli & Isenberg, 1991))

Gelingt es die Elementverteilung in einzelnen Zellbereichen zu bestimmen, so liegt es nahe, Veränderungen dieser Verteilungen zu untersuchen.

Im Herzmuskel wird der Kontraktionszyklus durch elektrische Signale ausgelöst. Elektrische Signale basieren auf Strömen, die sich unter Einwirkung von elektrochemischen Gradienten durch die Zellmembran bewegen. So löst ein Einstrom von Natrium- und Calciumionen eine Umpolung der Zellmembran aus. Diese bewirkt eine Freisetzung beträchtlicher Mengen von Calciumionen aus intrazellulären Zellkompartimenten. Der resultierende Anstieg der globalen intrazellulären Calciumkonzentration führt letztlich zur Aktivierung der kontraktilen Proteine und damit zur Kontraktion der Herzmuskelzelle. Die Kontraktion endet, wenn die intrazelluläre Calciumkonzentration wieder sinkt. Diese Abnahme kann sowohl durch Wiederaufnahme von Calciumionen in Zellorganellen als auch durch deren Auswärtstransport durch die Zellmembran zurück in den Extrazellularraum erfolgen. Sowohl Ionenbewegungen durch die Zellmembran oder durch die Membranen intrazellulärer Organellen als auch die Calcium Speicher- oder Freisetzungsfunktion einzelner Zellkompartimente modulieren somit die Kontraktionskraft der einzelnen Zelle und damit die Pumpfunktion des Herzmuskels.

Eine Hauptfrage vieler Untersuchungen ist es, welche Rolle einzelne Zellkompartimente bei der Steuerung der Zellfunktion spielen. Die an unterschiedlichen Zellkompartimenten ablaufenden Prozesse der Calciumfreisetzung und –speicherung, ihre zeitliche und quantitative Variation und mögliche pathologische Veränderungen sind deshalb Ziel zahlreicher Untersuchungen. Besonders strittig ist dabei die Rolle der Mitochondrien bei der Calciumhomöostase der Herzmuskelzellen.

Untersuchungen zur Rolle der Mitochondrien bei der Calciumhomöostase der Herzmuskelzelle haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt, nicht nur bei Gruppen, die mit unterschiedlichen Methoden arbeiten (Gunter & Pfeiffer, 1990; Isenberg *et al.*, 1993; Loew *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1998), sondern auch innerhalb der Gruppen, die mit Elektronenstrahlmikroanalyse (EPMA) arbeiten (Gallitelli *et al.*, 1999; Horikawa *et al.*, 1998; Moravec & Bond, 1992).

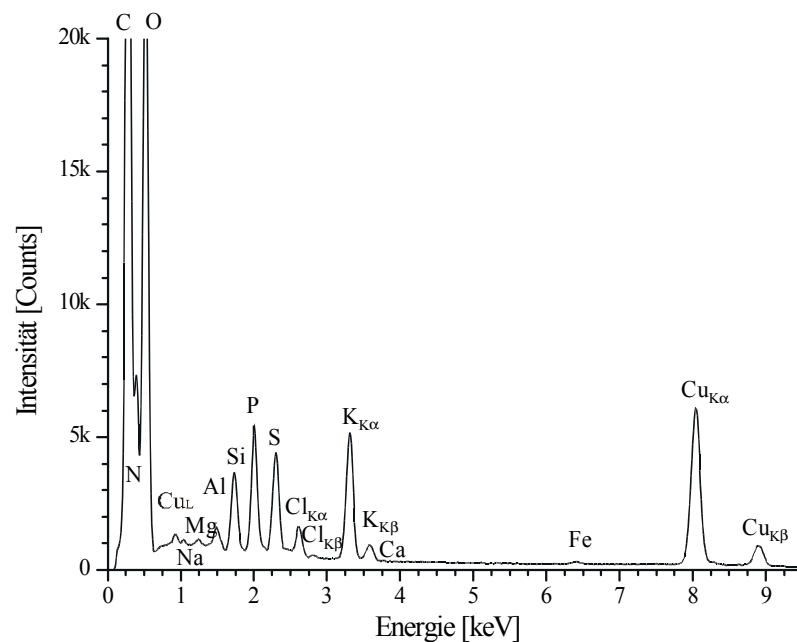
Es stellt sich nun die Frage, ob diese Unterschiede auf unterschiedlichen Messprotokollen und Präparationsmethoden beruhen, Fehlern bzw. Ungenauigkeiten in der Messmethode geschuldet sind oder ihre Ursachen in den verschiedenen Tiermodellen (Meerschwein, Frettchen, Ratte, Hamster) haben.

In dieser Arbeit sollen vor allem der Einfluss der verschiedenen messtechnischen Faktoren und die Fehlermöglichkeiten bei der quantitativen Auswertung der Messungen an Ventrikelmyozyten der Ratte untersucht werden. Ausgehend von den aus der Literatur bekannten

Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten sollen diese im Hinblick auf unsere speziellen Messbedingungen und Präparateigenschaften genauer analysiert und mögliche weitere Einflüsse erkannt und charakterisiert werden.

Einige aus der Literatur bekannte Probleme sind zum Beispiel Schwierigkeiten beim Einfrieren der biologischen Präparate unter Erhaltung der Ionenverteilung (beschrieben in (Wendt-Gallitelli & Wolburg, 1984; Zierold, 1991; Zierold, 1996)). Ebenso gibt es Untersuchungen zu den Problemen der Probenpräparation mittels Kryomikrotomie (Frederik, 1982; Sitte, 1996) und Gefriertrocknung (von Zglinicki & Zierold, 1989; Warley & Skepper, 2000). Die Auswirkungen von verschiedensten Einflüssen auf die Aufnahme der Spektren mittels energiedispersiver Detektoren (Statham, 1981; Schultz & Wendt-Gallitelli, 1998) und die dabei im Spektrum möglichen Artefakte sind aus (Fiori *et al.*, 1979; Fiori & Newbury, 1980) bekannt. Möglichkeiten, Einflüsse und Korrekturen bei der mathematischen Auswertung der Spektren sind zum Beispiel in (Shuman *et al.*, 1976; Kitazawa *et al.*, 1983; Statham, 1985; Statham, 1998) angesprochen. Informationen zu Wirkungen des Elektronenstrahls auf biologische Proben und zum Masseverlust finden sich unter anderem in (Zierold, 1988; Echlin, 1991).

Einer der Vorteile der energiedispersiven Elektronenstrahlmikroanalyse ist die gleichzeitige Erfassung der Konzentrationen aller biologisch interessanten Elemente. In Abbildung 1-1 ist ein typisches Spektrum einer Messung an einem Mitochondrium eines Ventrikelmyozyten der Ratte dargestellt.



**Abb. 1-1**

Mit einem energiedispersiven Germaniumdetektor an einem Philips CM12 Elektronenmikroskop mit 100 kV Anregungsspannung und 3.5 nA Strahlstrom aufgenommenes Röntgenspektrum. Als Probe diente ein 80x80 nm<sup>2</sup> großer Ausschnitt eines Mitochondriums eines Ventrikelmyozyten der Ratte. Die Indizes K $\alpha$  und K $\beta$  sind zur Trennung der Peaks der K $\alpha$ - und K $\beta$ -Linie eines Elementes angegeben. L steht für die L-Linie eines Elementes. Bei Elementbezeichnungen ohne Index handelt es sich immer um die K $\alpha$ -Linie.

Deutlich sichtbar sind die trotz relativ hoher Absorption dominierenden charakteristischen Peaks von Kohlenstoff und Sauerstoff, die verbunden mit dem nicht erfassbaren Wasserstoff die Hauptbestandteile der Proteine und Lipide der Zelle bilden.

In den Mitochondrien weist ein hoher Phosphoranteil auf stark ausgeprägte Membranstrukturen hin. Kalium ist das wesentliche freie intrazelluläre Ion zur Einstellung und Stabilisierung des Membranpotentials.

Elemente, die nicht zur biologischen Probe gehören und die Messung mehr oder weniger stark beeinflussen, sind Aluminium (im Probenhalter enthalten), Silizium als Kontamination aus dem Film und Kupfer (Bestandteil des Trägernetzes).

## 1.2 Bedeutung der statistischen Signifikanz zur Beurteilung der Messergebnisse

Zur Charakterisierung von Veränderungen in der Elementkonzentration während unterschiedlicher Phasen der Herzfunktion oder von Unterschieden zwischen gesunden und pathologisch veränderten Zellen ist es notwendig, die Ergebnisse statistisch zu vergleichen. Dabei werden die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD) einem Signifikanztest unterzogen. Bei vorgegebenem kleinen Fehlerbereich von z.B. 1% und festgestellter Signifikanz kann nachgewiesen werden, dass die verschiedenen funktionellen Zustände zu Veränderungen der Elementkonzentration führen. Ergibt sich außerdem noch eine Übereinstimmung mit elektrophysiologischen Messungen und Fluoreszenzmessungen der freien Ionenkonzentration, kann das Ergebnis als gesichert betrachtet werden.

Andererseits ist es durchaus fragwürdig, ob man bei einem vorhandenen Unterschied der Mittelwerte aber nicht nachgewiesener Signifikanz den Schluss ziehen kann, dass keine Veränderung vorliegt, zumal bei niedriger Wahl des Fehlerbereichs. Dies sei an folgendem Beispiel verdeutlicht: In einer Arbeit von (Keller *et al.*, 1997) beruht die im Titel aufgestellte Behauptung „Progression of left ventricular hypertrophy does not change the sarcoplasmic reticulum calcium store in the spontaneously hypertensive rat heart“ allein auf der Betrachtung der Messergebnisse und der Wahl des Signifikanzniveaus. Bei Calciumkonzentrationen von  $6.2 \pm 0.6 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  in Herzen von hypertensiven Ratten gegenüber  $4.5 \pm 0.4 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  in Kontrolltieren ( $\pm$ Fehler des Mittelwertes (SEM) für 109 bzw. 144 Messungen) wurde das Signifikanzniveau zu 0.01 gewählt. Wählt man dagegen ein Signifikanzniveau von 0.05, ergibt sich sehr wohl ein signifikanter Unterschied zwischen den spontan Bluthochdruck entwickelnden Ratten und der Kontrollgruppe. Da keine weitergehende quantitative Fehlerbetrachtung erfolgte, ist die im Titel getroffene Schlussfolgerung doch sehr gewagt. Eine Analyse der Messfehler hätte in diesem Fall klären können, ob die Ursache der großen Streuung der einzelnen Messwerte in der Versuchsanordnung lag und somit nur die gewählten Messbedingungen zu fehlerhaft waren, um einen höher signifikanten Unterschied nachzuweisen. Wenn andererseits die biologische Variabilität Ursache der großen Streuung war, so kann die getroffene Aussage durchaus ihre Berechtigung haben. Dies hätte durch eine höhere Anzahl von Messungen überprüft werden müssen.

Diese Arbeit beschäftigt sich damit, welche Fehlermöglichkeiten in einer solchen Analyse betrachtet werden sollten, welche man vernachlässigen kann und wie man apparative Fehler von individuellen Messfehlern und biologischen Variationen trennt. Am Ende soll an einem speziellen Beispiel aufgezeigt werden, unter welchen Bedingungen man mittels EPMA gesicherte Aussagen über vorhandene oder nicht vorhandene Unterschiede zwischen Elementverteilungen bei der Analyse gefriergetrockneter biologischer Präparate treffen kann.

teilungen bei der Analyse gefriergetrockneter biologischer Präparate treffen kann. Es wird sowohl auf die Messungen an biologischen Materialien, auf Vergleichsmessungen an externen Standards vorgegebener Konzentration und mineralischen Standards mit bekannter Konzentration, als auch auf die Verwendung von Simulationsrechnungen zum Trennen der einzelnen Einflussgrößen eingegangen.

### 1.3 Probleme bei der Bestimmung der Calciumkonzentration

Als spezielles Beispiel sollte die Frage der Ionenverteilung in Mitochondrien spontan hypertensiver Ratten (SHR-Ratten, SHR) im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren (Stamm Wistar Kyoto, WKY-Ratten, WKY) untersucht werden. Die spontan hypertensiven Ratten sind das am meisten untersuchte Tiermodell von Herz-Kreislauf-Krankheiten (Doggrell & Brown, 1998).

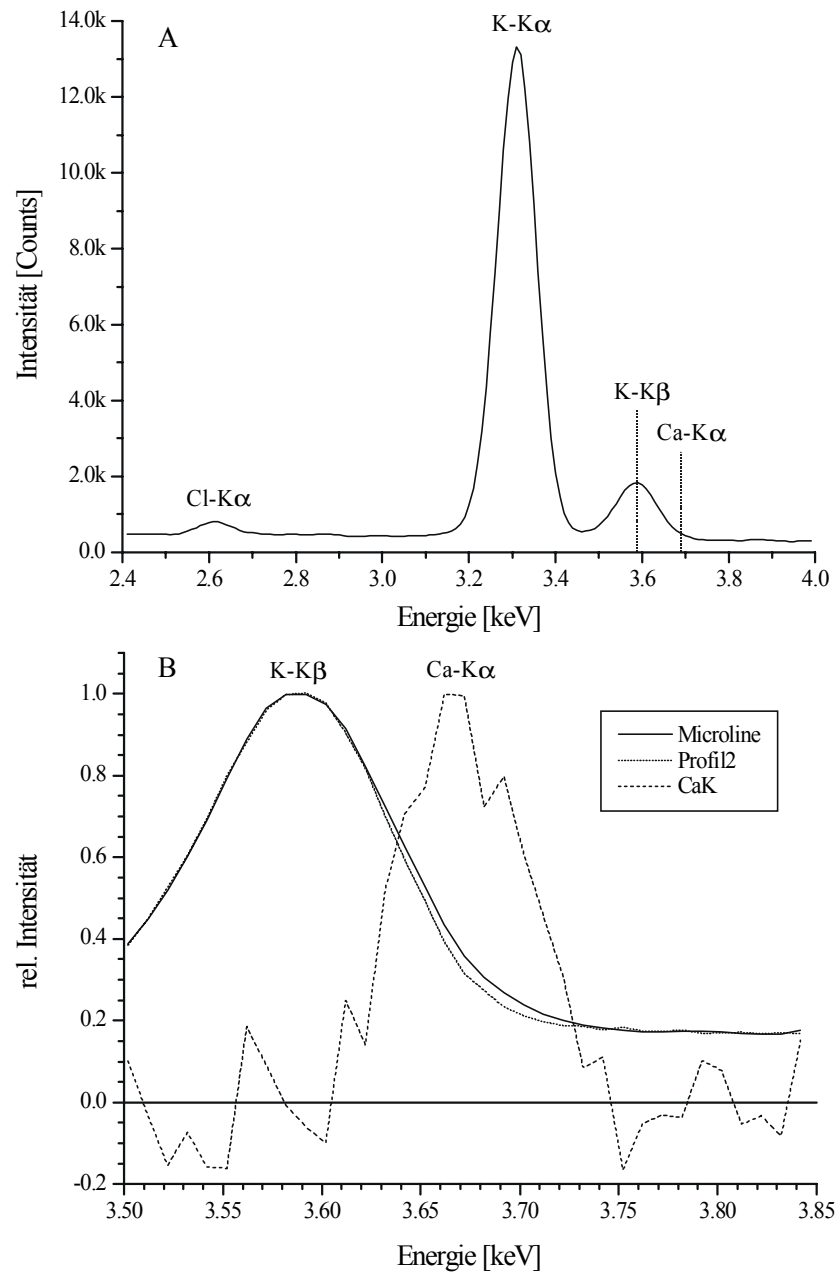
Das Hauptaugenmerk unserer Untersuchungen und dieser Arbeit richtet sich auf die Bestimmung der Calciumkonzentration. In der Literatur wird das mitochondriale Calcium als wichtiger Modulator der Energieproduktion der Zelle angesehen (Gunter *et al.*, 2000).

Bei der Bestimmung der Konzentration von Calcium ist die sorgfältige Analyse aller auftretenden Fehlermöglichkeiten und deren Vermeidung bzw. Einschätzung aus folgenden Gründen besonders wichtig:

1) In unseren biologischen Proben bewegen sich die Calciumkonzentrationen nur knapp oberhalb der Messgrenze (etwa  $3 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  im Cytosol und im Bereich  $0.5 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bei Mitochondrien, kg d.w. bedeutet Kilogramm dry weight und bezieht sich auf die Masse des analysierten Bereiches nach Gefriertrocknung).

2) Gerade in erregbaren Zellen mit hoher intrazellulären Kaliumkonzentration spielt das Problem der Überlappung der charakteristischen Peaks von Kalium und Calcium eine wesentliche Rolle bei der genauen Konzentrationsbestimmung von Calcium: Das Verhältnis zwischen Kalium- und Calciumkonzentration liegt im Bereich von etwa 300:1. Die Lage der charakteristischen Linien im Energiebereich ist dabei: Kalium-K $\alpha$ -Linie bei 3.31 keV, Kalium-K $\beta$ -Linie bei 3.59 keV und Calcium-K $\alpha$ -Linie bei 3.69 keV. Bei einer FWHM (Full Width at Half a Maximum Height, Maß zur Bestimmung der Detektorauflösung über Breite der Peaks) von etwa 100 eV befindet sich die Calcium-K $\alpha$ -Linie genau in der Flanke des Kalium-K $\beta$ -Peaks. Bei einem Verhältnis von etwa 10:1 zwischen Kalium-K $\alpha$ - und Kalium-K $\beta$ -Peak ergibt sich immer noch ein Verhältnis von 30:1 zwischen Kalium-K $\beta$ - und Calcium-K $\alpha$ -Peak. Zur Veranschaulichung dieses Problems dient Abbildung 1-2.

Hier wird klar, warum gerade für die Bestimmung von Veränderungen in der Calciumkonzentration zur Verdeutlichung biologischer bzw. funktioneller Abhängigkeiten die Fehleranalyse zur Verringerung der Streuung der Messwerte eine große Rolle spielt. Da bei den auftretenden kleinen Konzentrationen auch nur kleine Änderungen der Mittelwerte auftreten und die Anzahl der Messwerte material- und zeitlimitiert ist, kommt der Vermeidung aller nicht durch das Probenmaterial an sich bedingten Variationen der Messwerte eine entscheidende Rolle zu, um zu einer gesicherten Aussage hinsichtlich vorhandener oder nicht vorhandener signifikanter Veränderungen zu gelangen.

**Abb. 1-2**

A: Ausschnitt aus dem Spektrum eines mineralischen Standards mit einer Kaliumkonzentration von etwa  $1050 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ . Zu sehen sind der Kalium-K $\alpha$ - und Kalium-K $\beta$ -Peak und die Position des Calcium-K $\alpha$ -Peaks. Die enthaltene Calciumkonzentration beträgt etwa  $3 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ .

B: Hier ist der auf das Maximum normierte Kalium-K $\beta$ -Peak (Microline) des Spektrums aus A zusammen mit dem Verlauf des zur Konzentrationsbestimmung verwendeten Profils (Profil2, gestrichelte Linie) dargestellt. Bildet man die Differenz beider Linien, ergibt sich der Calcium-K $\alpha$ -Peak (ebenfalls auf sein Maximum normiert dargestellt, die Intensität im Maximum beträgt etwa 60 Impulse).



## 2 Probenpräparation und Messsystem

### 2.1 Präparation von Ventrikelmyozyten und Elektrophysiologie

Die Hauptuntersuchungsobjekte der Arbeitsgruppe Physiologie der Zellkompartimente des Julius-Bernstein-Institutes für Physiologie der Universität Halle waren in den letzten Jahren Ventrikelmyozyten von Meerschweinchen, Ratten und, wenn sich die Möglichkeit ergab, humane Ventrikelmyozyten.

Diese Zellen bedürfen einer langwierigen und sorgfältigen Präparation, um bei der Mikroanalyse reproduzierbare bzw. vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Nach der Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wurde das Herz freipräpariert und mittels Langendorff-Apparat mit Calcium-freier Lösung perfundiert. Danach wurde das Herz zur Isolation der Zellen mit einer Kollagenase enthaltenden Lösung durchspült. Nach Abtrennung des linken Ventrikels wurde dieser mehrfach eingeschnitten und die isolierten Zellen vorsichtig ausgeschüttelt. Diese wurden dann zwei Stunden in KB-Lösung gelagert (Isenberg & Klöckner, 1982). Hierbei wurde eine nach (Han *et al.*, 1994) modifizierte KB-Lösung verwendet. Danach wurden die Einzelzellen in physiologische Salzlösung mit 0.1  $\mu\text{M}$  Calcium überführt. Die Calciumkonzentration der Lösung wurde dann in zwei Schritten bis auf 0.5  $\mu\text{M}$  erhöht. In dieser Lösung verblieben die Zellen bis zur Entnahme zum Versuch.

Nach einer Methode von Gallitelli und Isenberg (Wendt-Gallitelli & Isenberg, 1989) erfolgte das Einfrieren der Einzelzellen unter Bedingungen der Spannungsklemme an einem elektrophysiologischen Messplatz. So war es möglich, aus der Stromspur Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand der Zelle zu erhalten und den Erfolg des Einfriervorgangs einzuschätzen.

Das Einfrieren konnte dabei zu definierten Zeiten, in Bezug auf den Erregungszustand der Zellen, durchgeführt werden. Dazu wurde die Kammer und das Beobachtungsmikroskop mittels Luftdruck entfernt (Wendt-Gallitelli & Wolburg, 1984) und ein Becher mit Propan der Temperatur von flüssigem Stickstoff schnell um den Halter mit der Zelle bewegt und diese somit schockgefroren.

Die Lösung in den Haltern, in denen die Zellen eingefroren wurden, hatte folgende Zusammensetzung: 150 mM NaCl, 20 mM Glucose, 5 mM HEPES, 5.4 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , aufgefüllt auf 1 Liter Wasser und 150 g Albumin zugesetzt.

Das Albumin dient dabei als Gefrierschutzmittel. Gefrierschutzmittel werden der Badlösung zugesetzt, um im einfrierenden Gewebe die Bildung von Eiskristallen zu reduzieren (Wendt-Gallitelli, 1987). Gefrierschutzmittel sind hochmolekulare organische Verbindungen wie Dextran (Wheeler-Clark & Tormey, 1987), Polyvinylpyrolidon (Roomans & Barnard, 1982) oder Albumin (Somlyo *et al.*, 1977b).

### 2.2 Präparation von Standards für die Mikroanalyse

#### Standards für Standardfaktoren

Als Standards für die Bestimmung der zur quantitativen Analyse nach der Kontinuummethode von Hall (Hall *et al.*, 1973) notwendigen Standardfaktoren werden in Wasser gelöste Salze vorgegebener Konzentration verwendet. Diesen werden Dextran, Albumin oder Phosphitin

(Shuman *et al.*, 1976) beigemischt, bis der Wasseranteil etwa 80 % entspricht. Bei diesen Stoffen handelt es sich um makromolekulare Stoffe bzw. Proteine, die in etwa die Zusammensetzung der Zellmatrix hinsichtlich Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff besitzen.

Ein Tropfen der Standardlösung wird auf einem Pin als Halter für das Kryoschneiden in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Propan eingefroren und ist somit für das Kryoschneiden präpariert.

Des Weiteren wurden mineralische Standards getestet. Diese wurden in kleinste Bestandteile zermahlen, mittels eines kleinen Tropfens flüssigen Araldits auf einen ausgehärteten Aralditblock aufgeklebt und mittels Ultramikrotomie geschnitten. Die Konzentrationen sind aus anderen Messungen bekannt (Jarosewich *et al.*, 1979).

### Standards für Profile

Außer den Standards zur Ermittlung der Standardfaktoren und damit zur Bestimmung von absoluten Konzentrationen sind noch Präparate notwendig, aus denen Spektren zur Bestimmung der sogenannten Profile gewonnen werden können. Ein Profil ist der gespeicherte und für die Auswertung der Spektren verwendete Kurvenverlauf eines charakteristischen Peaks eines Elementes im Röntgenspektrum.

Der Vorteil in der Verwendung gemessener Peaks für die Profile, im Gegensatz zu mathematisch erzeugten Gauß-Peaks, liegt darin, dass keine Annahmen hinsichtlich der Peakform gemacht werden. So verändert der Effekt der unvollständigen Ladungssammlung z.B. für jeden Kristall in einmaliger Art die Form des Peaks. Stimmen Peakformen der Profile und im Spektrum nicht genau überein, gibt es vor allem Probleme bei der Entfaltung von sich überlappenden Peaks.

Daher ist es notwendig, die Spektren für die Profile aus Präparaten zu gewinnen, bei denen die Messungen den Bedingungen in den später zu untersuchenden Proben entsprechen. So ist zum Beispiel nicht nur einfach ein Kristall einer getrockneten Salzlösung (enthält das gewünschte Element in hoher Konzentration) zu verwenden und lange und mit hohen Zählraten zu messen (Warley, 1997), sondern die Präparatdicke und auch die Präparatbeschichtung sollten schon in den Größenordnungen der zu untersuchenden Probe liegen.

## **2.3 Herstellung von Trägerfilmen**

Als Träger für die zu untersuchenden Proben müssen die von uns verwendeten weitmaschigen Kupfernetze (50 mesh, das entspricht etwa 0.4 mm Maschenweite) mit dünnen Kunststofffilmen beschichtet werden. Dazu wird Pioloformpulver (Firma Wacker Chemie, München) in 0.3%-igen Dichloräthan gelöst. Wird diese Lösung auf die Wasseroberfläche getropft, bildet sich ein dünner Film. Auf diesen werden die Netze aufgelegt und dann mit dem Film zusammen mit Papier aufgenommen. Zum Aufnehmen wird bei uns üblicherweise das Deckpapier von Parafilm verwendet. Anschließend werden die befilmten Netze in Gefäßen mit Molekularsieb getrocknet.

## 2.4 Kryoschneiden, Gefriertrocknung und Probenbeschichtung

### Kryoschneiden

Nach dem Schockgefrieren am Einzelzellmessplatz werden die in den Silberhaltern befindlichen Ventrikeldmyozyten mit den Haltern auf spezielle Träger zur Befestigung im Ultrakryomikrotom montiert. Dies geschieht unter ständiger Bedeckung mit flüssigem Stickstoff, um ein Auftauen der Halter und damit verbundene Veränderungen der lokalen Elementkonzentrationen zu verhindern.

Die montierten Halter werden dann in einem Ultrakryomikrotom der Firma Leica (früher Reichert, einem Reichert F4 Ultracut) befestigt und dort mit Diamantmessern der Firma Diatome geschnitten. Die Einstellungen zum Schneiden der Halter sind dabei: Kammertemperatur  $-155^{\circ}\text{C}$ , Messertemperatur  $-140^{\circ}\text{C}$  und Probertemperatur  $-136^{\circ}\text{C}$ . Das Problem beim Schneiden der Proben ist, dass sowohl biologische Materialien, als auch Silber vom Halter und Glas von der Patchelektrode geschnitten werden müssen, weshalb ein Diamantmesser benutzt wird. Die am Ultracut 4 eingestellte Schnittdicke betrug 220 nm.

Da die Zelle innerhalb des Halters nicht genau lokalisierbar ist, werden in einem Schneidvorgang ungefähr 650 Schnitte angefertigt und damit etwa 20 Netze belegt. Durch elektrostatische Aufladungen und Turbulenzen der Stickstoffatmosphäre kommt es zum Verlust von Schnitten, da diese verspringen. Die mit Schnitten belegten Netze werden in einer speziell angefertigten Transportvorrichtung, die mit flüssigem Stickstoff ständig gekühlt wird, innerhalb des Ultrakryomikrotoms aufbewahrt. Diese Transportvorrichtung wird nach Beendigung des Schneidvorgangs zum Übergang in die Gefriertrockeneinrichtung verwendet, damit sich die Schnitte nicht erwärmen.

Ausführliche Informationen zur Problematik des Kryoschneidens sind in (Sitte, 1996) dargestellt.

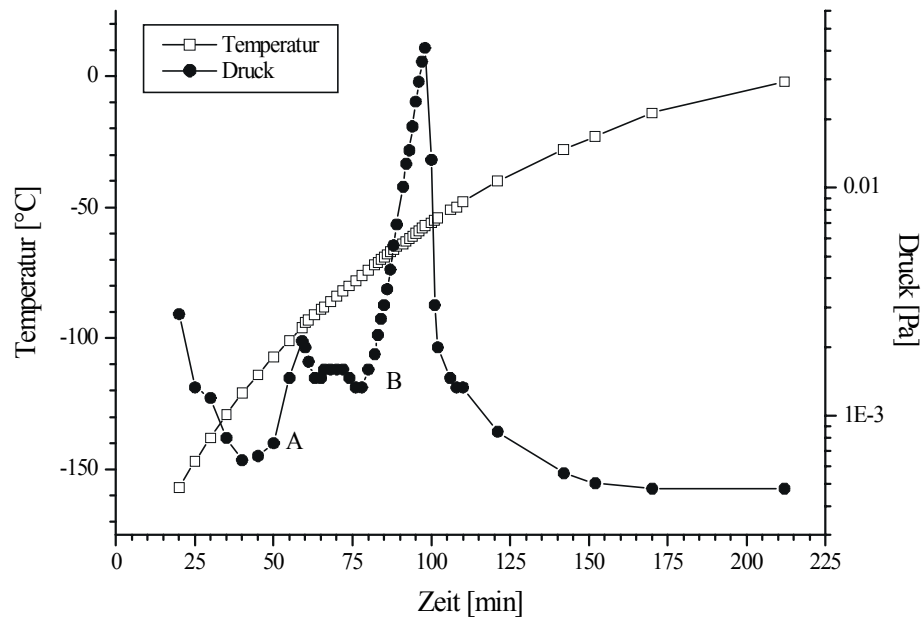
### Gefriertrocknung und Probenbeschichtung

Die Netze mit den Kryoschnitten werden mit flüssigem Stickstoff in der Transportvorrichtung bis zur Montage in der Gefriertrockeneinrichtung gekühlt. Die Gefriertrockeneinrichtung (MED 020 der Firma Bal-Tec, jetzt Balzers AG Liechtenstein) wird auf  $-180^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt.

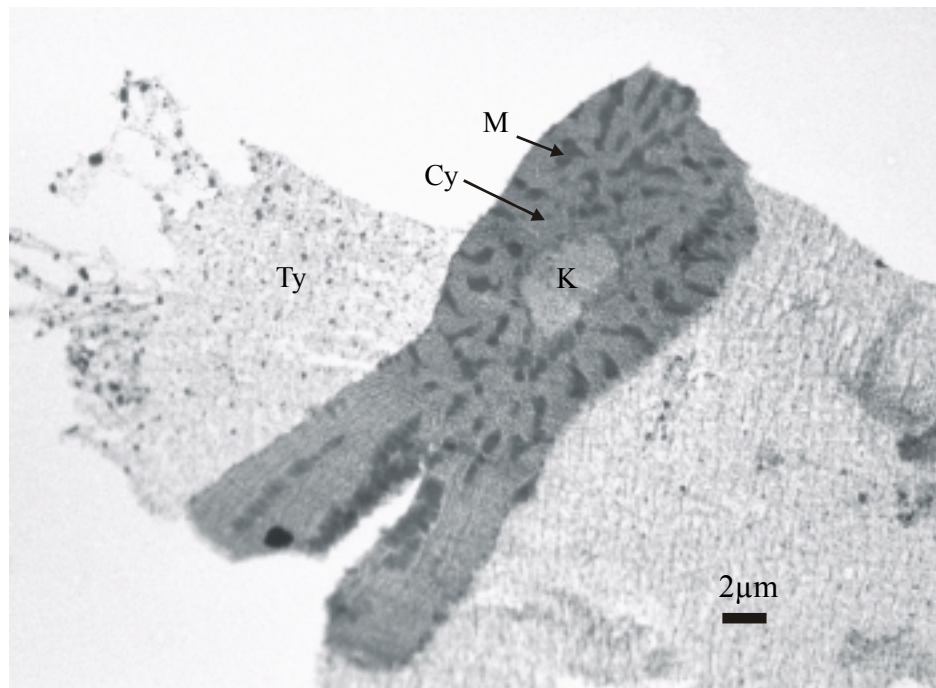
Nach Montage der Halterung für die Netze in der MED 020 wird diese auf ein Vakuum von etwa  $1 \cdot 10^{-4}$  Pa gebracht. Wird beim nun folgenden langsamen Erwärmen die Sublimationskurve für Wasserdampf erreicht, beginnt die Gefriertrocknung, das heißt, das in den Schnitten befindliche Wasser sublimiert. Dies beginnt bei etwa  $-100^{\circ}\text{C}$  in Abhängigkeit von dem in der Anlage erreichbaren Vakuum (Abbildung 2-1).

Nach dem Gefriertrocknen und wieder Aufwärmen auf Zimmertemperatur werden die Netze mit einer etwa 3-4 nm starken Lage reinen Kohlenstoffs beschichtet. Dazu besitzt die MED 020 einen Elektronenstrahlverdampfer und einen Quarzschwinger zur Dickenmessung des aufgetragenen Materials.

Durch die Gefriertrocknung wird der morphologische Kontrast verstärkt, da die Kompartimente unterschiedlich viel Wasser enthalten. Abbildung 2-2 zeigt einen gefriergetrockneten Schnitt eines Ventrikeldmyozyten vom Meerschwein. Hierbei handelt es sich um einen Schnitt quer durch die Zelle. Deutlich sichtbar sind Zellkompartimente wie Kern, Mitochondrien und Cytosol sowie die die Zelle umgebende Badlösung (Tyrode).

**Abb. 2-1**

Verlauf von Druck und Temperatur bei der Gefriertrocknung von Kryoschnitten in der Gefriertrockenanlage MED 020. Die Erwärmung erfolgt durch die Raumluft langsam von außen her ohne zusätzliche Heizung. Bei Punkt A Sublimation des am Rezipienten niedergeschlagenen Wassers, bei Punkt B Sublimation des Probenwassers.

**Abb. 2-2**

Transmissionselektronenmikroskopisches Bild eines gefriergetrockneten Schnittes eines Ventrikelmyozyten. M-Mitochondrium, K-Kern, Cy-Cytosol, Ty-Tyrode

Weiterhin ist erst mittels Gefriertrocknung eine quantitative Mikroanalyse mit großer Präzision möglich. Bei hydratisierten Proben wäre der ständige Masseverlust unter dem Elektronenstrahl zu groß, um eine genaue Konzentrationsbestimmung zu erreichen. Außerdem ist in diesen Proben der Kontrast im elektronenmikroskopischen Bild sehr schwach und damit die eindeutige Identifizierung von Zellkompartimenten und ihren Grenzen erschwert (Zierold, 1988). Allerdings ergeben sich bei gefriergetrockneten Proben Probleme beim Vergleich von Messungen mit unterschiedlichen Wasseranteilen vor der Gefriertrocknung. Die berechnete Konzentration im Trockenanteil erhöht sich bei größerem Wasseranteil vor der Gefriertrocknung und kann so zu scheinbaren Konzentrationsunterschieden führen.

## 2.5 Elektronenmikroskop CM12

Zur Erzeugung der Röntgenquanten in der Probe und für die Abbildung wurde in unserem Messsystem ein Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop mit Scanning-Einheit verwendet (engl.: Scanning transmission electron microscope – STEM). Das CM12 verfügt über eine TWIN-Objektivlinse mit großem Abstand für die Mikroanalyse und speziellen Kondensorblenden mit geringem Eigenstrahlungsanteil (sogenannte Low Background Blenden). Die maximal erreichbare Beschleunigungsspannung beträgt 120 kV. Während der Messungen wurde eine LaB<sub>6</sub>-Kathode als Strahlungsquelle verwendet. Die Messungen erfolgten im Scanning-Mode mit einem durch die Geometrie der verwendeten LaB<sub>6</sub>-Kathode und die sphärische Aberration der Kondensor-2-Blende bedingten Strahldurchmesser von etwa 16 nm (Angabe Firma Philips, aus Unterlagen zum Mikroskop CM12/STEM). Der Probenstrom betrug zwischen 1 und 3.5 nA. Ein Probenstrom von 2 nA entspricht bei dem oben angegebenen Strahldurchmesser einer Elektronendosis von etwa  $7 \cdot 10^7 \text{ e}^- (\text{nm}^2 \text{ s})^{-1}$ . Da aber immer über einen größeren Bereich gescannt und keine Punktanalyse durchgeführt wird, reduziert sich die Elektronendosis erheblich. Für einen gescannten Messbereich von etwa je 150 nm Länge und Breite in einem Mitochondrium würde die Elektronendosis also nur noch  $5.5 \cdot 10^5 \text{ e}^- (\text{nm}^2 \text{ s})^{-1}$  betragen.

Zur Kontrolle der Netze und der Lokalisation der Schnitte der Ventrikelmyozyten sowie für Verteilungsmessungen wird ein spezieller Halter mit verringerter Streustrahlung, ein sogenannter „Low Background Holder“ der Firma Philips genutzt. Bei diesem ist die Netzaufgabe aus Beryllium, so dass es im Spektrum kaum zu zusätzlichen Strahlungsanteilen durch den Halter kommt.

Für die Messungen in den Zellkompartimenten wird ein Kryohalter für tiefe Temperaturen der Firma Gatan genutzt (Cryotransfer System Model 626). Mit diesem ist es möglich, das Netz im Mikroskop bis auf Temperatur des flüssigen Stickstoffs abzukühlen bzw. mit der dazugehörigen Regelung (Gatan Model 613-500 cooling holder control) jede beliebige Temperatur zwischen dieser und der Raumtemperatur einzustellen. Wegen des in unserem Philips CM12 maximal erreichbaren Vakuums von  $2 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}$  werden die gekühlten Messungen allerdings bei minimalen  $-110^\circ\text{C}$  durchgeführt, da für einen Druck von  $1.2 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}$  die Sublimationstemperatur von Wasser bei  $-120^\circ\text{C}$  liegt. Somit könnte es bei Verwendung von tieferen Temperaturen zur Kontamination von Wasser auf der Probe kommen.

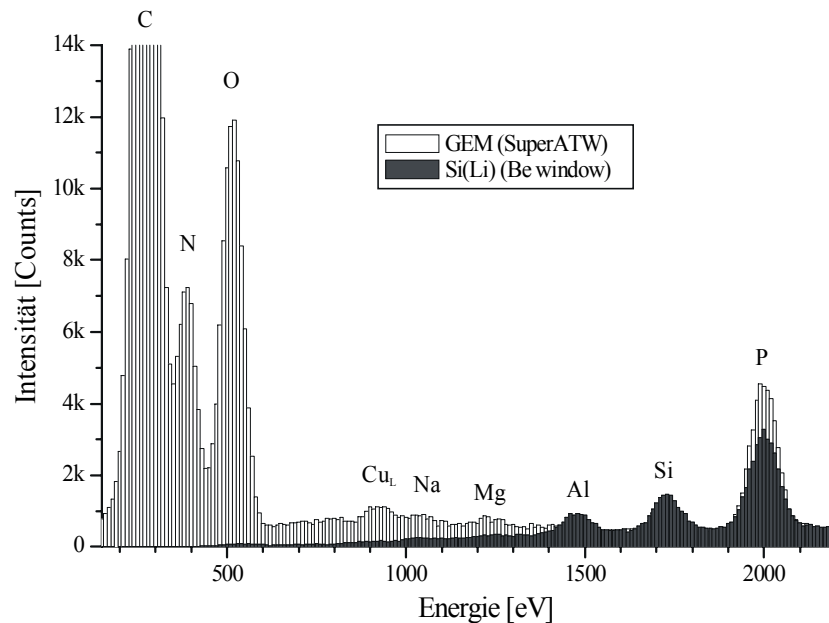
## 2.6 Energiedispersiver Röntgendetektor und Analysesystem

### Energiedispersiver Röntgendetektor

Zur Detektierung der bei der Wechselwirkung der energiereichen Elektronen mit der Probe entstehenden Röntgenstrahlung dient ein energiedispersiver Röntgendetektor (engl.: energy dispersive x-ray detector – EDX-detector). Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ein Germaniumdetektor der Firma Oxford Instruments (Link GEM-Detektor) benutzt. Der Detektorkristall aus reinem Germanium hat eine Oberfläche von 30 mm<sup>2</sup> und ist unter einem Winkel von 20° zur Horizontalen an einem Seitenflansch der Mikroskopsäule angebracht. Der Raumöffnungswinkel beträgt 0.117 sr, das heißt, es werden bei angenommener räumlicher Gleichverteilung der in der Probe entstehenden Röntgenquanten etwa nur 1% davon im Detektor aufgefangen.

Germanium hat im Gegensatz zu Silizium, dem gebräuchlichsten Kristall für energiedispersive Kristalldetektoren, eine kleinere Energielücke und damit eine größere Elektronenausbeute pro Röntgenquant. Dadurch wird die Linienverbreiterung im Energiespektrum geringer. Der von uns verwendete Germanium-Detektor hat eine Energieauflösung von 120 eV bei der K $\alpha$ -Linie von Mangan (Mn<sub>K $\alpha$</sub> ). Die Auflösung wird dabei über die Maßzahl FWHM, das heißt über die Breite des Energiepeaks bei der halben Höhe des Maximums definiert. Die Auflösung bei Na<sub>K $\alpha$</sub>  beträgt für den Germanium-Detektor 77 eV und bei Ca<sub>K $\alpha$</sub>  103 eV. Der Detektor ist mit einem sehr dünnen Folienfenster (SuperATW) versehen. Dieses hat eine Stärke von etwa 400 nm mit einer zusätzlichen Aluminiumschicht von 40 nm und lässt Röntgenquanten der Energie 1 keV zu etwa 95 % passieren. Mit diesem Fenster ist es somit auch möglich, charakteristische Röntgenstrahlung der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff zu detektieren (Schultz *et al.*, 1999). Abbildung 2-3 zeigt ein mit dem GEM-Detektor und Super-ATW-Fenster aufgenommenes Spektrum im Vergleich mit einem Spektrum, welches mittels Si(Li)-Detektor und Beryllium-Fenster an einem vergleichbaren Präparat aufgenommen wurde.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung eines Germanium-Detektors besteht in der Tatsache, dass die Energie die zur Erzeugung von Röntgenquanten der Germanium-K-Linien nötig ist, über 9 keV liegen muss. Da in unseren biologischen Proben nach der Präparation maximal charakteristische Linien von etwa 8 keV auftreten (Cu-K-Linien aus den Kupfernetzen) und auch das Kontinuum im Energiebereich über 9 keV keine nennenswerte Intensität besitzt, ist die Wahrscheinlichkeit der Erzeugung sogenannter Escape-Linien sehr gering. Escape-Linien entstehen, wenn ein in den Detektorkristall einfallender Röntgenquant nicht vollständig in Ladungsträger umgewandelt wird, sondern einen spezifischen Röntgenquant des Detektormaterials erzeugt. Dann kann die Restenergie als charakteristische Linie detektiert werden.



**Abb. 2-3** Spektren für identische Mikroskopeinstellungen und ähnliche Präparate im Energiebereich von 0 eV bis 2200 eV aufgenommen mit: GEM (SuperATW)-Germanium Detektor mit ultradünnem Plastfenster und Si(Li) (Be window)—Silizium Detektor mit Beryllium-Fenster (8  $\mu\text{m}$ )

### Analysesystem

Zur Aufnahme der Röntgenspektren wurde ein Analysesystem ISIS 300 der Firma Oxford Instruments Inc., Oxford, UK, verwendet.

Das Analysesystem ist mit einem digitalen DXP50 Pulsprozessor mit 6 Verarbeitungszeiten (1-6), 4 Energiebereichen (0-10, -20, -40, -80 keV) und 3 möglichen Kanalzahlen (1000, 2000, 4000) versehen. Alle Einstellungen des DXP50 werden über die Software unter Kontrolle des Auswertecomputers vorgenommen. Der Pulsprozessor ist verantwortlich für die Verstärkung des vom Vorverstärker (am Detektorkristall) kommenden Signals, die Totzeitkorrektur, die Unterdrückung der Impulsaufstockung (pile-up), die obere Energiebegrenzung und die Digitalisierung des Signals. Die Elektronik erwies sich als sehr stabil mit einer guten Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Zuordnung der Röntgenquanten zur Energieskala.

Bei unseren Messungen wurde die Einstellung mit der größtmöglichen Prozesszeit (Prozesszeit 6) und der Energiebereich von 0-10 keV mit 1000 Kanälen verwendet.

Bei der größtmöglichen Prozesszeit ergibt sich die im System kleinstmögliche FWHM, das heißt, die beste Auflösung. Die Verwendung dieser Prozesszeit ist bei unseren Proben und Mikroskopeinstellungen möglich, da die sehr dünnen Präparate und die materialschonende Elektronendosis (kleiner Strahlstrom), die Zählrate verhältnismäßig niedrig halten. Sie beträgt im Mittel 800 Counts (Impulse) pro Sekunde (cps) für Messungen im Cytosol und 1400 cps für Messungen in den Mitochondrien. Die mittlere Messzeit für ein Spektrum betrug etwa 600-800 Sekunden aktive Messzeit und 800-1000 Sekunden Gesamtmesszeit. Das heißt, die Totzeit lag in der Regel unterhalb 25%.

Der Energiebereich von 0-10 keV wurde gewählt, da alle biologisch interessanten Elemente dominante charakteristische Linien unterhalb 10 keV besitzen. Zudem liegen die Energien der charakteristischen Linien der Fremdelemente Kupfer, Aluminium und Silizium ebenfalls un-

terhalb 10 keV, so dass eine vollständige Konzentrationsanalyse und alle Korrekturen in diesem Bereich möglich sind. Auf Grund der geringen Zählrate wurde eine Kanalanzahl von 1000 Kanälen gewählt, womit sich eine Kanalbreite von 10 eV ergibt.

## 2.7 Software zur Datenaufnahme und Verarbeitung

Von Oxford-Instruments wurde eine Software zur Aufnahme der Spektren und zu ihrer Auswertung mitgeliefert. Das nach der Hall-Methode und dem gefilterten MLSQ-Verfahren (MLSQ – Multiple Least Square) funktionierende Modul BIOQUANT ist aber im Detail fehlerhaft und vor allem in seinen Parametern, wie Filter, Kalibrierung, Wichtungsmatrix für MLSQ-Fit fest und somit für die von mir durchgeführten Untersuchungen ungeeignet.

Deswegen wurde die Auswertesoftware völlig neu erstellt, so dass ein genauer Eingriff an allen Stellen der Auswerteprozedur möglich wurde. Weiterhin wurde eine Software zur Simulation erstellt, um Spektren mit vorgegebenen Verlauf und echter stochastischer Verteilung zu erzeugen. Die Programme für Imaging und Verteilungsbilder wurden ebenfalls selbst erstellt, wobei der Analysator über Funktionen einer von Oxford gelieferten Softwarebibliothek angesteuert wird.

### Mapping und Imaging

Ein Anschluss für externen Zugriff am CM12 erlaubt die Verbindung mit einem äußeren Rechner über eine AD/DA-Karte und damit die Steuerung der Positionierung des Elektronenstrahls im Scanning-Mode und das Einlesen der Signalpegel von Hell- und Dunkelfelddetektor. Dadurch ist es möglich, durch den externen Rechner Bilder aufzunehmen, diese als morphologische Dokumentation zu speichern oder als Ausgangspunkt für örtliche Elementkonzentrationsverläufe zu verwenden. Solche örtlichen Konzentrationsverläufe werden in Form von Linien (Linescans) oder flächenhaften Verteilungen (sogenannten Mappings) aufgenommen. Der Strahl wird durch den externen Rechner positioniert, ein Spektrum gesammelt und ausgewertet und der nächste Messpunkt angesteuert.

Das Programm ist dabei so aufgebaut, dass während der Messung an einem Punkt das Spektrum der vorhergegangenen Messung ausgewertet wird und so die örtliche Verteilung der Konzentrationen von ausgewählten Elementen schon während der Messung entsteht.

### Zeitabhängige Analysen

Werden Spektren über einen längeren Zeitraum in kleinen aufeinander folgenden Zeitintervallen gesammelt, ist eine zeitabhängige Bestimmung des Konzentrationsverlaufes möglich.

Dies erlaubt dann wieder Aussagen über Art und Größe von Masseverlust und Kontamination.

Hierbei ist darauf zu achten, dass man nicht nur die zeitlichen Konzentrationsverläufe analysiert, sondern auch die Verläufe der Anzahl Counts in den charakteristischen Peaks eines Elementes betrachtet. Ein Masseverlust im Element kann nämlich durch einen parallel laufenden Masseverlust in der Matrix aufgehoben werden und so für dieses Element zu einer gleichbleibenden Konzentration führen. Auf den Masseverlust im Detail wird bei den jeweiligen Kapiteln zu Messungen an Standards (Kapitel 3.5) oder biologischen Proben (Kapitel 6) eingegangen.



### 3 Auswertung der EDS-Spektren

#### 3.1 Kalibrierung von Position und Auflösung (Resolution)

Für die genaue Zuordnung zwischen Spektrum und Energiekanälen ist eine Kalibrierung des Spektrums auf Peaks bekannter Position notwendig. Wenn möglich werden zwei Peaks am Anfang und Ende des Spektrums gewählt, um eine möglichst genaue Kalibrierung der Position aller in diesem Bereich des Spektrums vorhandener Peaks zu gewährleisten. Dabei handelt es sich um eine lineare Kalibrierung, die eventuelle Nichtlinearitäten der Detektorfunktion zwischen den beiden gewählten Peaks nicht berücksichtigt.

Bei uns wird dazu der sogenannte Strobe-Peak (Bezeichnung von Oxford Instruments, strobed zero peak) bei der nominalen Energie von 0 keV genutzt. Dieser Peak wird nicht im Detektor sondern im Pulsprozessor erzeugt. Er dient gleichzeitig als Nullpunktkorrektur. Mit dem in all unseren Spektren durch die Verwendung von Kupfernetzen vertretenem Kupfer-K $\alpha$ -Peak, steht ein weiterer Peak bei hohen Energien (8.041 keV) zur Verfügung.

Die Kalibrierung der Position im Spektrum erfolgt nicht über eine Änderung der Energieskala. Das würde zu verschiedenen Skalen und damit Transformationsproblemen zwischen dem Spektrum der Probe und den für den MLSQ-Fit aufgenommenen Profilspektren führen. Vielmehr erfolgt die Kalibrierung über eine Anpassung des Spektrums an die vorgegebene Energieskala. Außerdem ist noch eine Kalibrierung für mögliche Veränderungen der Detektorauflösung (Breite der Peaks) zwischen dem Zeitpunkt der Aufnahme der Profile und des zu analysierenden Messspektrums zu berücksichtigen. Dies geschieht über einen Vergleich der Auflösung (FWHM) des sogenannten Strobe-Peaks des Probenspektrums mit den bei der Aufnahme der Spektren für die Profile ermittelten Auflösungen (FWHM) dieses Peaks.

Die Kalibrierung des Spektrums erfolgt nun durch eine Faltung des Originalspektrums  $S(E)$  mit einem Gauß-Peak nach:

$$(3-1) \quad \hat{S}(E) = \int_{-\infty}^{\infty} S(E-u) \exp\left(-\frac{(u-h)^2}{4w}\right) du$$

(Kitazawa *et al.*, 1983). Dabei stellen  $h$  die Positionskorrektur und  $w$  die Korrektur der Auflösung dar.  $u$  ist die Integrationsvariable im Energiebereich. Das Energieintervall  $du$  ist in unserem Fall 10 eV groß (entspricht der von uns verwendeten Kanalbreite des digitalen Pulsprozessors).

Das Spektrum  $\hat{S}(E)$  ist somit hinsichtlich der Position von Strobe-Peak und Kupfer-K $\alpha$ -Peak und der Resolution des Strobe-Peaks kalibriert. Die Positionskalibrierung  $h$  ergibt sich im Einzelnen aus:

$$(3-2) \quad h = E_{0\text{Strobe}} + \left(1 - \frac{E_{\text{CuK}\alpha} - E_{0\text{Strobe}}}{8.041 \text{ keV} - 0 \text{ keV}}\right) E$$

Hier sind  $E_{0\text{Strobe}}$  die gemessene Mittenenergie des Strobe-Peaks und  $E_{\text{CuK}\alpha}$  die gemessene Energie des Kupfer-K $\alpha$ -Peaks. Für diese Korrekturformel wird ein linearer Verlauf der Abweichung zwischen nomineller und gemessener Energie zwischen Strobe-Peak und Kupfer-K $\alpha$ -Peak vorausgesetzt.

Die Korrektur zur Kalibrierung der Detektorauflösung  $w$  ergibt sich aus:

$$(3-3) \quad w = \frac{\text{FWHM}_{\max}^2 - \text{FWHM}_0^2}{16 \ln(2)}$$

$\text{FWHM}_0$  ist die Resolution des Strobe-Peaks des gemessenen Spektrums.  $\text{FWHM}_{\max}$  erhält man aus der maximalen Auflösung der Strobe-Peaks von Messspektrum und Profilen. Die Auflösung  $\text{FWHM}$  eines Gauß-Peaks hängt mit der Standardabweichung  $\sigma$  der Gaußverteilung über Gleichung 3-4 zusammen:

$$(3-4) \quad \text{FWHM} = 2 \sigma \sqrt{2 \ln 2}$$

### 3.2 Digitale Filterung

Es gibt im wesentlichen zwei Verfahren zur Beseitigung des durch Bremsstrahlung entstandenen Untergrundes aus energiedispersiven Röntgenspektren.

Das zuerst entwickelte Verfahren benutzt die Kramers Gleichung (Kramers, 1923).

$$(3-5) \quad I_B(E) = K \frac{E_0 - E}{E}$$

Diese stellt eine Beziehung zwischen der Intensität der Untergrundstrahlung  $I_B$  (Anzahl der detektierten Röntgenstrahlen im Energieintervall = Counts) und der Energie  $E$  her. In die Konstante  $K$  gehen dabei unter anderen der Strahlstrom und die mittlere Ordnungszahl der Probe ein.  $E_0$  ist die Energie der anregenden Elektronen, in unseren Fall also 100 keV. Die Kramers Gleichung kann also zur Modellierung des energieabhängigen Untergrundverlaufes verwendet werden. Probleme treten vor allem in Energiebereichen auf, die durch Absorption am Detektorfenster beeinflusst werden. Weiterhin ist die Wahl der Stützstellen für die Modellierung in einem mit vielen charakteristischen Linien überlagerten Untergrund schwierig, zeitaufwendig und durchaus subjektiv.

Von Statham wurde in Anlehnung an (Schamber, 1977) in (Statham, 1977) ein Verfahren dargestellt, das einen digitalen Filter zur Untergrundbeseitigung verwendet.

Die Intensität der kontinuierlichen Strahlung ist im wesentlichen eine stetige und langsam variierende Funktion der Energie. Man kann daher annehmen, dass das Kontinuum für kleine Energiebereiche in erster Näherung einen linearen Verlauf hat. Es wird also ein Filter benötigt, der sowohl konstante als auch lineare Funktionen unterdrückt, aber die charakteristischen Peaks (in erster Näherung Gaußkurven) in Form und Größe erhält.

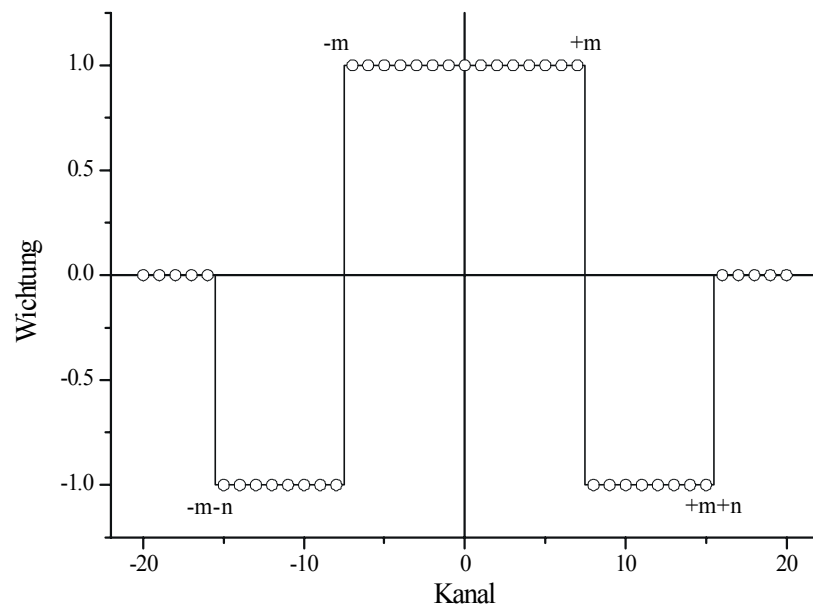
Statham empfiehlt den sogenannten Top-Hat-Filter (THF).

Die Gleichung für den Top-Hat-Filter lautet:

$$(3-6) \quad S_i^* = \frac{1}{2m+1} \sum_{k=-n}^n S_{i+k} - \frac{1}{2n} \left( \sum_{k=-(n+m)}^{-(n+1)} S_{i+k} + \sum_{k=n+1}^{n+m} S_{i+k} \right)$$

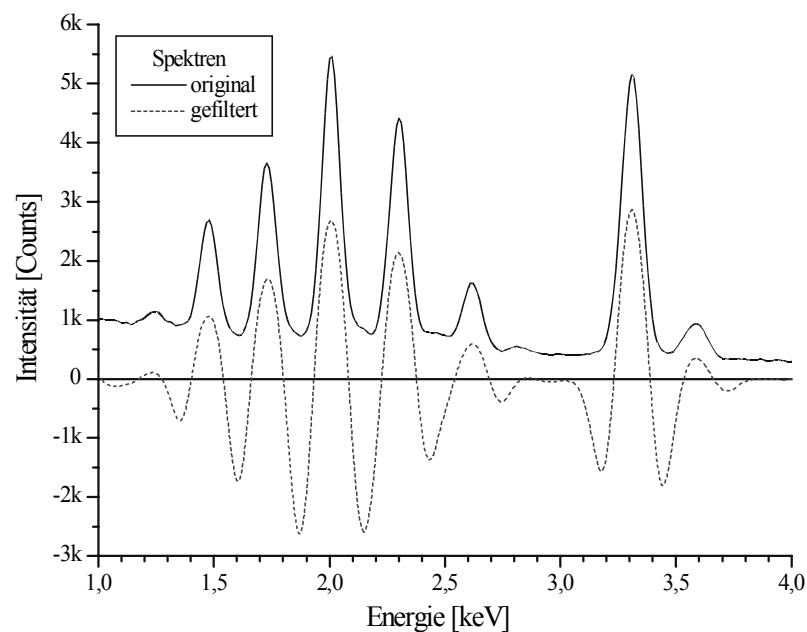
$S_{i...}$	Counts des Originalspektrums in Kanal $i$
$S_i^*$	Counts im Top-Hat-gefilterten Spektrum in Kanal $i$
$2m+1...$	Anzahl der inneren Werte
$2n$	Anzahl der äußeren Werte

Abbildung 3-1 zeigt den Verlauf eines solchen Filters.



**Abb. 3-1** Darstellung eines THF-Filters der Größe  $m=7$  und  $n=8$  (Empfehlung aus (Statham, 1977)), angepasst auf Kanalbreite von 10 eV. Statham hatte  $m=3$  und  $n=4$  für eine Kanalbreite von 20 eV vorgeschlagen.

Dieser Filter transformiert die charakteristischen Peaks in Peaks an derselben Stelle mit gleicher Intensität. Konstante bzw. linear verlaufende Funktionen werden vollständig unterdrückt. Zusätzlich wird noch die statistische Streuung reduziert, das heißt, das Spektrum wird geglättet. Abbildung 3-2 zeigt die Anwendung solch eines Filters auf das Spektrum einer Messung an einem Mitochondrium. Deutlich sichtbar ist die Eliminierung des Kontinuumsanteils des gemessenen Spektrums.

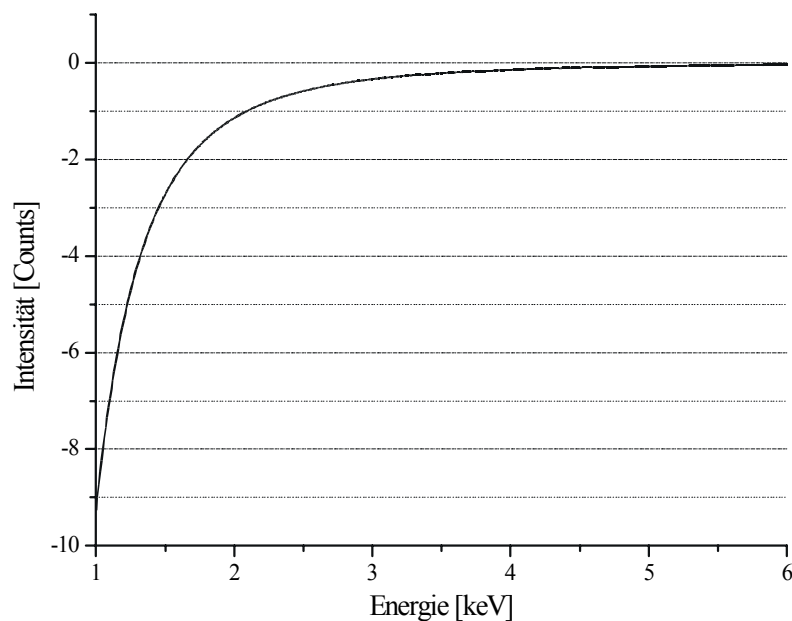


**Abb. 3-2** original: gemessenes Spektrum mit charakteristischen Peaks und Kontinuum; gefiltert: mit Top-Hat-Filter gefiltertes Spektrum

Das Verfahren der digitalen Filterung macht keine Annahmen über externe Parameter und erfordert keinen Dialog mit dem Benutzer. Es behandelt das Spektrum objektiv einfach als eine mathematische Gleichung. Es ist in die meisten Verfahren der automatischen quantitativen Auswerteprogramme integriert, so unter anderem in das Modul „Bioquant“ der Auswertesoftware „ISIS“ von Oxford Instruments.

Probleme mit der Subtraktion des Bremsstrahlungsanteils (Kontinuum) gibt es nur in den Teilen des Spektrums, die im Bereich der Filtergröße stark vom linearen Verlauf abweichen. Dies ist der Fall an Absorptionskanten von Elementen und im Absorptionsbereich des Detektorfensters.

Wendet man einen Filter der Größe  $m=7$ ;  $n=8$  auf eine Funktion nach Gleichung 3-5 an, so ergibt sich bei einer für Mitochondrienmessungen typischen Anzahl von etwa 200 Counts pro Kanal im Bereich der Energie der Calcium- $K\alpha$ -Linie ein Restkontinuum nach Abbildung 3-3. Aus dieser Abbildung kann man entnehmen, dass im Bereich der Calcium-K-Linien das Restkontinuum unterhalb 0.5 Counts liegt und damit kleiner als 0.25 % des ungefilterten Kontinuums ist. Der dadurch entstehende Fehler bei der Berechnung der Calciumkonzentration ist somit vernachlässigbar, da er im Rundungsfehler bei der Rechnung mit ganzen Zahlen liegt. Dies ist bei Zählereignissen stets der Fall. Erst im stärker ansteigenden Bereich um eine Energie von 1 keV erreicht das Restkontinuum nach Filterung einen Wert von größer 1% des Ausgangskontinuums. Aber in diesem Bereich ist das Kontinuum auf Grund der Absorption am Fenster des Detektors und in der Probe sowieso schon verändert und ein zusätzlicher Fehler von etwa 1 % vernachlässigbar.



**Abb. 3-3**

Nach Filterung mit Top-Hat-Filter der Dimension  $m=7$ ;  $n=8$  verbliebenes Kontinuum bei einem der Kramers Gleichung gehorchenden Kontinuumverlauf mit einer Größe von 200 Counts pro Kanal bei einer Energie von 3.69 keV.

### 3.3 MLSQ-Fit

Die Bestimmung der Strahlungsanteile der charakteristischen Strahlung eines Elementes  $i$  (Peak Area  $Pa_i$  des Elementes  $i$ ) im gemessenen Spektrum erfolgt mittels gefiltertem Multiplex-Least-Square-Fit (filtered MLSQ). Dabei werden die mittels Top-Hat-Filter (Kapitel 3.2) gefilterten sogenannten Profile (Spektren der charakteristischen Strahlung eines Elementes) an das ebenfalls gefilterte Probenspektrum angepasst.

Die Matrixgleichung zur Bestimmung der Koeffizienten lautet:

$$(3-7) \quad [\mathbf{P} \mathbf{M} \mathbf{P}^T] \underline{\mathbf{c}} = \mathbf{P} \mathbf{M} \underline{\mathbf{S}}^*$$

$\mathbf{P}$ ...	Matrix der Profile
$\mathbf{M}$ ...	Wichtungsmatrix
$\underline{\mathbf{S}}^*$ ...	Vektor des gefilterten Probenspektrums
$\underline{\mathbf{c}}$ ...	Koeffizientenvektor (Lösung des MLSQ-Fits)

Aus den im Fit ermittelten Koeffizienten  $c_i$  lassen sich die Impulse der charakteristischen Linie der jeweiligen Elemente  $i$  (peak area  $Pa_i$ ) durch Multiplikation mit dem dazugehörigen Profil  $\mathbf{P}_i$  ermitteln:

$$(3-8) \quad Pa_i = c_i \mathbf{P}_i^T$$

#### 3.3.1 Bestimmung der Wichtungsmatrix

Die Wichtungsmatrix  $\mathbf{M}$  hat einen großen Einfluss auf die Ergebnisse des MLSQ-Fits und kann verschiedene Formen haben. Als einfachste Variante werden die Diagonalelemente der Matrix 1 gesetzt (keine Wichtung). Oder man besetzt die Diagonalelemente mit den Varianzen der Werte des Spektrums, wobei ausgehend von einer Poissonverteilung die Varianz dieser gleich dem Erwartungswert (hier gemessener Wert im Spektrum) ist.

Die von Statham (Statham, 1977) vorgeschlagene Variante berücksichtigt den Top-Hat-Filter und hat die Form:

$$(3-9) \quad \begin{aligned} M_{ii} &= \text{var}(S_i^*) = \left( \frac{1}{2m+1} \right)^2 \sum_{k=-m}^m S_{i+k} + \left( \frac{1}{2n} \right)^2 \left( \sum_{k=-(m+n)}^{-(m+1)} S_{i+k} + \sum_{k=m+1}^{m+n} S_{i+k} \right) \\ M_{ij} &= 0 \quad i \neq j \end{aligned}$$

Es handelt sich also um eine Diagonalmatrix mit nur in der Hauptdiagonale von Null verschiedenen Werten. Dabei wird nur vorausgesetzt, dass die Werte im gemessenen Spektrum unabhängig und poissonverteilt sind (siehe Kapitel 5.1).

Bei dieser Matrix wird der Top-Hat-Filter nur bei den Diagonalelementen der Matrix, also den Varianzen des Top-Hat-gefilterten Spektrums berücksichtigt. Durch die Anwendung des Top-Hat-Filters kommt es allerdings zur Erzeugung von Abhängigkeiten zwischen den benachbarten Kanälen im gefilterten Spektrum, womit die Kovarianzen ungleich Null werden. Dies ist ein bis jetzt in der Literatur bei der Spektrenauswertung mit Top-Hat-gefiltertem MLSQ-Fit unberücksichtigter Aspekt.

Wollte man nun die vollständige Kovarianzmatrix des gefilterten Spektrums als Wichtungsmatrix verwenden, was vom mathematischen Standpunkt der exakten Lösung entspräche, müsste man die Kovarianzelemente  $M_{ij}$  wie folgt berechnen:

$$(3-10) \quad M_{ij} = \text{cov}(S_i^* S_j^*) = \sum_{k=-n-m}^{n+m} h_k h_{i-j+k} S_{i+k}$$

mit  $h_k = \begin{cases} \frac{1}{2m+1} & \text{für } |k| \leq m \\ \frac{1}{2n} & \text{für } m < |k| \leq m+n \end{cases}$

Bei der Wichtungsmatrix  $\mathbf{M}$  handelt es sich in diesem Fall um eine Bandmatrix mit  $2(n+m)$  von Null verschiedenen Nebendiagonalen. Auf Grund der erheblich erweiterten Rechenzeit und der aus ersten Analysen nicht sichtbaren deutlichen Verkleinerung des statistisch bedingten Anteils an der Verteilungsbreite, wurde jedoch bei allen in dieser Arbeit erfolgten Rechnungen die oben erwähnte Diagonalmatrix verwendet.

Die Herleitung der Gleichung 3-10 ist im Anhang (Abschnitt: Mathematische Ergänzungen) dargestellt.

### 3.3.2 Berücksichtigung von Detektorfunktionsschwankungen im MLSQ-Fit

Die Zuordnung zwischen Messkanälen und Energie der auf den Detektor einfallenden Röntgenquanten (Detektorfunktion) unterliegt in Abhängigkeit von Umgebungseinflüssen gewissen Schwankungen.

Um Differenzen hinsichtlich Zuordnung der Energie und Kanalnummer (Position) sowie Änderungen im Rauschen des Detektors und des Analysesystems (Auflösung, Resolution) zwischen Aufnahme der Profile und Aufnahme des zu analysierenden Spektrums auszugleichen hat Kitizawa (Kitizawa *et al.*, 1983) eine Korrektur vorgeschlagen. Dabei wird zusätzlich zu den Profilen deren erste Ableitung (ergibt in erster Näherung eine Verschiebung der Profile bei Annahme eines Gaußprofils) und deren zweite Ableitung (ergibt in erster Näherung eine Veränderung der Breite der Profile) mit in den MLSQ-Fit einbezogen. Das bedeutet, die Matrix der Profile  $\mathbf{P}$  besitzt  $N$  Spalten (Anzahl der Elemente gesamt) bzw.  $2N$  oder  $3N$  Spalten.

### 3.4 Kontinuummethode nach Hall

Zur quantitativen Bestimmung der Elementkonzentrationen in biologischen gefriergetrockneten Schnitten wird die Kontinuummethode nach Hall verwendet (Hall, 1979a). Die Konzentration  $c_i$  eines Elementes  $i$  lässt sich folgendermaßen bestimmen:

$$(3-11) \quad c_i = \frac{Pa_i}{W} \frac{\overline{Z^2/A}}{\text{Stf}_i}$$

$Pa_i \dots$  Summe der charakteristischen Strahlungsquanten des Elementes  $i$  (berechnet mittels gefiltertem MLSQ-Fit, Peakintegral, peak area)

$W \dots$  korrigiertes Kontinuumintegral

$\overline{Z^2/A}$  ... gewichteter Mittelwert aller Quotienten von  $(Z^2/A)_i$  für die in der Probe enthaltenen Elemente  $i$  ( $Z$ ... Ordnungszahl des Elementes,  $A$ ... molare Masse des Elementes)  
 $Stf_i$  ... Standardfaktor des Elementes  $i$  (bestimmt aus Messungen an Standards bekannter Konzentrationen)  
 (Bezeichnungen in Anlehnung an (Warley, 1997)).

### 3.4.1 Korrektur probenfremder Kontinuumanteile

Das Kontinuumintegral  $W$  ist die in der Probe entstehende Bremsstrahlung in einem beliebig gewählten, aber dann festen Energiebereich. Der einmal gewählte Energiebereich muss deshalb konstant sein, weil damit die elementspezifischen Standardfaktoren durch Umstellen von Gleichung 3-11 gewonnen wurden. Für all unsere Analysen wurde der Kontinuumbereich von 1 bis 5 keV gewählt. In diesem Bereich ist die Entstehungswahrscheinlichkeit für Röntgenstrahlung und damit die Quantenausbeute relativ hoch, da die Bremsstrahlung der Kramers-Gleichung gehorcht (Gleichung 3-5). Im Bereich unterhalb 1 keV kommt es zur Absorption am Detektorfenster und im Bereich oberhalb 5 keV zu keinem vollständigen Abbremsen der Röntgenquanten im Detektorkristall und zu einer starken Beeinflussung des Kontinuums durch Anteile vom Netz. So ist nur im von uns gewählten Bereich die Strahlung, die auf das Detektorsystem fällt, zu 100% registrierbar (unter Vernachlässigung der zählratenabhängigen Totzeit des Analysesystems und von Absorption in der Probe). Die Bremsstrahlung ist in sehr dünnen Schnitten bei vernachlässigbaren sekundären Effekten proportional der Anzahl der gesamten Atome im Messbereich.

Die gesamte Bremsstrahlung  $W_{ges}$  ergibt sich aus der Summe der in der Probe entstehenden Bremsstrahlung  $W$ , der im Film entstehenden Bremsstrahlung  $W_{Film}$  und der extern angeregten Bremsstrahlung (in Netz und Halter)  $W_{ext}$ . Somit ergibt sich für  $W$ :

$$(3-12) \quad W = W_{ges} - W_{Film} - W_{ext}$$

Um nur den Kontinuumanteil der Probe zu erhalten, muss also der Anteil von Film und externen Komponenten bestimmt werden. Der Kontinuumanteil des Films wird bestimmt, indem man bei gleichen Mikroskopeinstellungen (Probenstrom, Tiltwinkel) und Analysatoreinstellungen (Einstellung der Diskriminatoren = Process-Time) ein Spektrum eines Filmbereiches in der Nähe des Probenschnittes (gleiche Masche des Netzes) ohne Probe aufnimmt. Hieraus bestimmt sich dann das Kontinuum des Films  $W'_{Film}$ . Wenn man davon ausgeht, dass sich die Messbedingungen nicht ändern, muss der Filmkontinuumanteil bei der eigentlichen Probenmessung nur noch hinsichtlich eventuell aufgetretener unterschiedlicher Messzeiten korrigiert werden. Die Anzahl der Impulse ist bei konstanten Messbedingungen und Probenverhältnissen der Messzeit direkt proportional. Als eigentliche Filmkorrektur ergibt sich also aus den Messzeiten für Probe  $t_{Probe}$  und Film  $t_{Film}$ :

$$(3-13) \quad W_{Film} = W'_{Film} \frac{t_{Probe}}{t_{Film}}$$

Zur Korrektur externer Bestandteile werden Markerelemente verwendet, die nur im externen Anteil und nicht in der Probe auftreten (bei Netzen z.B. Kupfer). Man geht davon aus, dass der Kontinuumanteil dieser Elemente der charakteristischen Strahlung proportional ist. Somit

kann aus einer Bestimmung des Kontinuumanteils ohne Probe  $W'_{\text{ext}}$  (nur externe Anteile) und des Verhältnisses der Summe der Impulse  $Pa$  des Markerelementes (in Probe und ohne Probe), der externe Kontinuumanteil an der Probenmessung ermittelt werden:

$$(3-14) \quad W_{\text{ext}} = W'_{\text{ext}} \frac{Pa_{\text{Marker, Probe}}}{Pa_{\text{Marker, ohne Probe}}}$$

### 3.4.2 $Z^2/A$ -Korrektur (Ordnungszahlkorrektur)

Der Anteil der Bremsstrahlung ist nicht nur der Schnittdicke, dem Probenstrom und der Messzeit proportional, sondern er ist auch abhängig von der Zusammensetzung der darin enthaltenen Elemente, das heißt vom Verhältnis zwischen dem Quadrat der Ordnungszahl ( $Z^2$ ) und der Atommasse ( $A$ ) der einzelnen Elemente (Hall, 1979a).

Dieses Verhältnis  $Z^2/A$  muss in der Berechnung der Konzentrationen berücksichtigt werden, da die Zusammensetzung von Standards und Messproben nur ähnlich, aber nie genau gleich sein kann. Der Mittelwert von  $Z^2/A$  kann dazu iterativ bestimmt werden (Roomans, 1981), da für die Mittelwertberechnung der Anteil der einzelnen Elemente bekannt sein muss und wiederum der Mittelwert von  $Z^2/A$  nach Gleichung 3-11 zur Berechnung der Elementkonzentrationen notwendig ist. Man gibt dazu einen Wert von etwa 3.2 (ergibt sich aus der Zusammensetzung von H, C, N und O) für biologische Proben vor und berechnet nach Gleichung 3-11 die Massenanteile aller vorkommenden Elemente. Dann wird daraus folgendermaßen wieder der Mittelwert von  $Z^2/A$  bestimmt:

$$(3-15) \quad \overline{Z^2/A} = \sum_{i=1}^N c_i \frac{Z_i^2}{A_i}$$

Dies wird rekursiv fortgesetzt; bis die Differenz zwischen zwei aufeinanderfolgend berechneten Mittelwerten kleiner als eine vorgegebene Schwelle ist.

Diese aus der Literatur übernommene Methode kann allerdings auch durch eine direkte Berechnung ersetzt werden. Setzt man nämlich Gleichung 3-11 in 3-15 ein und stellt nach dem Mittelwert von  $Z^2/A$  um, ergibt sich:

$$(3-16) \quad \overline{Z^2/A} = \frac{1}{1 - \frac{1}{W} \sum_i \frac{P_i}{Stf_i} \frac{Z_i^2}{A_i}}$$

Da alle Werte auf der rechten Seite von Gleichung 3-16 nach dem MLSQ-Fit bekannt sind, lässt sich der Korrekturfaktor also auch direkt berechnen.

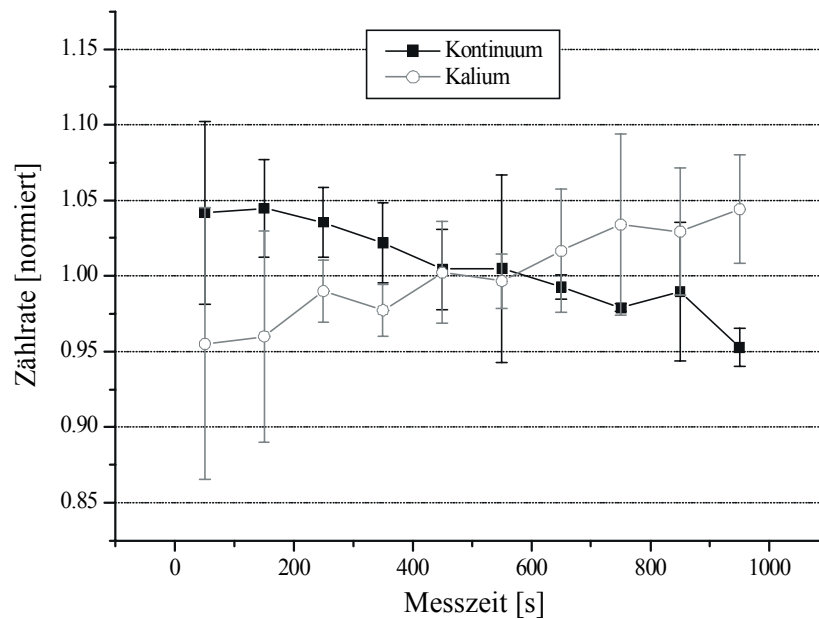


### 3.5 Bestimmung von Standardfaktoren

#### 3.5.1 Standards mit Dextran

In der Literatur wird häufig Dextran als organische Matrix zur Bestimmung von Standardfaktoren oder zur Simulation biologischer Proben benutzt (Zierold, 1986).

Dextran ist ein Mehrfachzucker mit der Summenformel  $(C_6H_{10}O_5)_n$  und einem mittleren Molekulargewicht von 110000 g/mol. Es hat eine gemessene Dichte von etwa 1.5 g/cm<sup>3</sup>. Wir verwendeten für die Präparation der Dextranstandards Dextran der Firma Fluka (Biochemika 31391).



**Abb. 3-4** Zeitabhängiger Verlauf der normierten Zählrate (die Zählrate für jeweils 100 s Messzeit wurde auf die durchschnittlichen Zählrate für gesamte Messzeit bezogen) für Kontinuum und charakteristische Strahlung von Kalium eines  $KH_2PO_4$ -Dextran-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für je 5 Messungen.

Wie die Abbildung 3-4 zeigt, kommt es während der von uns standardmäßig verwendeten Messzeit zu einem etwa 10%-igen Abfall im Kontinuum, was hauptsächlich auf einen Verlust an Sauerstoff zurückzuführen ist. Gleichzeitig kommt es zu einer Anreicherung mit Kalium, so dass die Konzentrationsbestimmung über das Verhältnis von Kaliumpeak zu Kontinuum äußerst schwankend und fehlerbehaftet ist. Dabei ergibt sich für beide Effekte eine Abhängigkeit von der Messzeit und damit von der in die Probe eingebrachten Elektronendosis. Dies tritt auf, obwohl die Dosis auf Grund der relativ großen bestrahlten Messgebiete (etwa  $1.5 \times 1.5 \mu m$ ) im Vergleich zu den Mitochondrienmessungen klein gehalten wurde.

Weiterhin zeigen die verschiedenen Schnitte der Dextranstandards untereinander sehr große Abweichungen in der Konzentration der zugemischten Elemente. Dies ist wahrscheinlich in dem relativ großen Molekulargewicht des Dextrans und der gegenüber Wasser großen Dichte begründet, da es dadurch zu einem schlechten Mischverhalten kommt. So zeigen von der Oberfläche des Dextran-Salz-Gemisches entnommene Proben eine wesentlich höhere Salz-

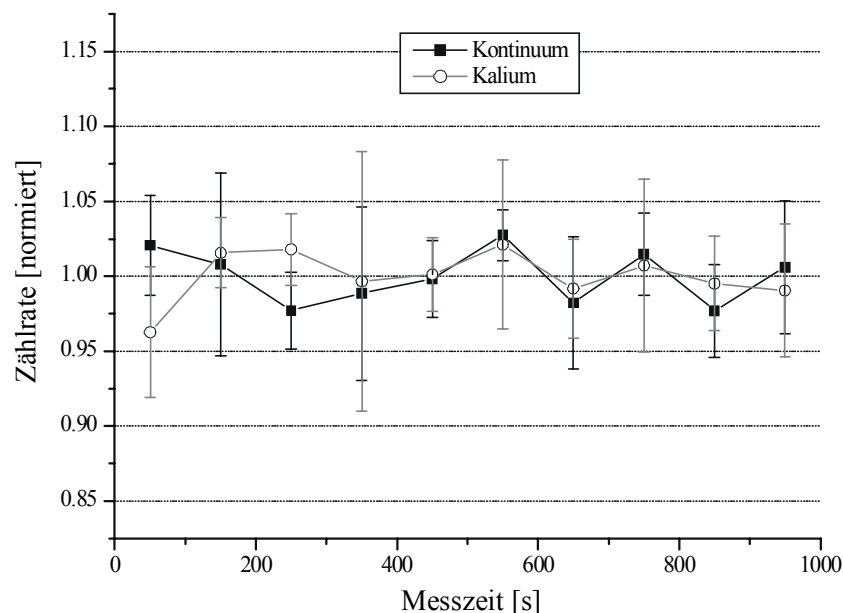
konzentration als die aus der Mitte der angesetzten Lösung entnommenen Proben. Insgesamt zeigt sich somit, dass Dextran als Matrix für die Standards zur quantitativen EPMA an biologischen Proben nicht besonders gut geeignet ist.

### 3.5.2 Standards mit Albumin

Albumin ist ein hochmolekulares Protein (Molekulargewicht ca. 67000 g/mol) und wird bei uns in Form des Serumalbumins vom Rind verwendet (Firma Sigma-Aldrich, Bestellnummer A 3803). Es ist ein natürlich in hoher Konzentration im Blutplasma vorkommendes Protein. Es dient als Bindungsstelle zum Stofftransport und über den kolloidosmotischen Druck zur Regulierung der Filtration und Resorption von Plasmaflüssigkeit. Als wesentliches nicht leichtes Element ist Schwefel in einer Konzentration von 590-605 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> (Shuman *et al.*, 1976) enthalten.

Albumin zeigt im Gegensatz zu Dextran unter unseren Standardmessbedingungen kaum Masseverlust. Des Weiteren sind die Elementkonzentrationen über den Messzeitraum hinreichend stabil, so dass sich Albumin-Salz-Gemische gut zur Bestimmung der Standardfaktoren eignen.

Dies ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Die Schwankungen der Mittelwerte der Zählraten von Kontinuum und von charakteristischer Strahlung des Kaliums liegen für jeweils 100 s-Bereiche unterhalb 3 % und damit im Fehlerbereich der Zählstatistik. Es zeigt sich kein auf Masseverlust hinweisender Abfall der Kurve mit zunehmender Messzeit. Alle Messungen wurden an Albuminstandards mit 600 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> KCl bei -110°C und einem Strahlstrom von 3.1 nA bei einem Messbereich von 1.4x2 µm<sup>2</sup> aufgenommen. Dies entspricht einer Dosis von etwa 7000 e<sup>-</sup> (s nm<sup>2</sup>)<sup>-1</sup>.



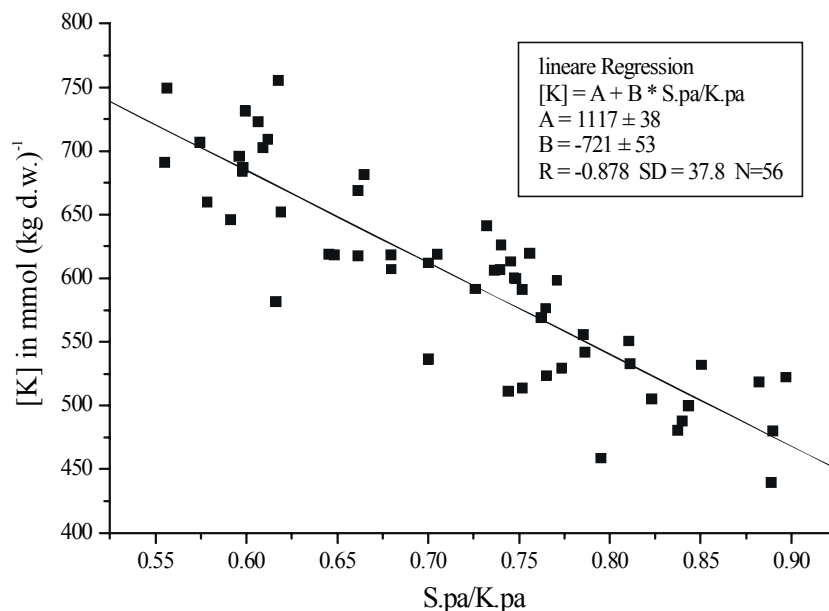
**Abb. 3-5** Zeitabhängiger Verlauf der normierten Zählrate (die Zählrate für jeweils 100 s Messzeit wurde auf durchschnittlichen Zählrate für die gesamte Messzeit bezogen) für Kontinuum und charakteristische Strahlung von Kalium eines KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Albumin-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für je 5 Messungen.

Bei einem Standard aus Albumin und Kaliumchlorid mit einer Konzentration von  $600 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  KCl im Albumin (4.473% Massenanteil) ergab sich bei 56 Messungen eine mittlere Konzentration von  $599.9 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bei einer Standardabweichung von  $78.3 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ . Diese Standardabweichung entspricht etwa 13 % vom Messwert. Das weicht erheblich von der für ein mittleres Kontinuum von 90000 Counts (entspricht etwa einer Höhe des Kontinuums von 150 Counts bei 3.69 keV) und eine Kaliumkonzentration von  $600 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  aus Simulationsrechnungen ermittelten Standardabweichung von  $4.5 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bzw. 0.8 % ab. Hier stellt sich nun die Frage, wodurch die große Differenz in den Verteilungsbreiten (Standardabweichungen) bedingt ist.

In die Verteilung bei den Simulationsrechnungen gehen nur die statistischen Schwankungen ein. Zusätzliche Fehler bei den Messungen durch Schwankungen der Detektorfunktion können vernachlässigt werden, da die mittlere gemessene Positionsverschiebung des Kaliumpeaks nur 0.26 eV betrug. Fehler durch Korrekturen des Kontinuums können maximal 5 % betragen, da die mittlere Filmkorrektur 11.6 % und die mittlere Gridkorrektur 4.7 % vom Gesamtkontinuumanteil betragen. Hierbei wird von einem maximalen Fehler der Filmkorrektur von 20 % und einem maximalen Fehler der Gridkorrektur von 50 % ausgegangen (siehe Kapitel 3.4.1).

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen können die messtechnisch bedingten Abweichungen vom vorgegeben Wert  $600 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  maximal eine Verteilung mit der Standardabweichung von etwa  $30 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  erzeugen. Die Differenz zu den aus den Messungen ermittelten  $78.3 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  muss also andere Ursachen besitzen.

In Abbildung 3-6 ist die ermittelte Kaliumkonzentration in Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen Schwefelpeak und Kaliumpeak aufgetragen.



**Abb. 3-6**

Zusammenhang zwischen gemessener Kaliumkonzentration in einem Albumin-KCl-Standard und Verhältnis der charakteristischen Peaks von Schwefel und Kalium; die lineare Regression ergab dabei einen Anstieg der Geraden von  $B = -721 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  und ein Absolutglied von  $A = 1117 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bei einem Regressionskoeffizienten von  $R = -0.878$  und  $N = 56$  Messungen.

Es zeigt sich eine deutliche lineare Korrelation zwischen beiden Größen im Messbereich. Dies lässt den Schluss zu, dass es Probleme mit der gleichmäßigen Verteilung des Kaliumchlorids im Albumin gibt. Benutzt man das Schwefel als Marker für die Albuminkonzentration, so nimmt mit zunehmendem Schwefelanteil der Kaliumanteil ab, was für ein Mischungsproblem spricht. Die Regression liefert eine Standardabweichung von  $37.8 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ , was dem oben berechneten Wert von  $30 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  schon wesentlich näher kommt. Weitere Schwankungen sind sicherlich durch eine geringe Ungleichverteilung der Schwefelkonzentration im Albumin bedingt.

Das Problem lässt sich nun folgendermaßen theoretisch beschreiben:

Die Gesamttrockenmasse setzt sich aus dem Kaliumchloridanteil und dem Albuminanteil zusammen ( $c$  in Massefraktionen) und es gilt:

$$(3-17) \quad c_{\text{KCl}} + c_{\text{Albumin}} = 1$$

Der Kaliumchloridanteil lässt sich aus der Kaliumkonzentration in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$  unter Berücksichtigung der Maßeinheiten folgendermaßen bestimmen:

$$(3-18) \quad c_{\text{KCl}} = [\text{K}] \frac{A_{\text{KCl}}}{10^6}$$

Ist  $[\text{S}]_{\text{Alb}}$  die Schwefelkonzentration in reinem Albumin, ergibt sich der Albuminanteil zu:

$$(3-19) \quad c_{\text{Alb}} = \frac{[\text{S}]}{[\text{S}]_{\text{Alb}}}$$

Ist  $k_{\text{SK}}$  der Cliff-Lorimer-Faktor (Cliff & Lorimer, 1975) für Schwefel und Kalium, ergibt sich die Schwefelkonzentration aus:

$$(3-20) \quad [\text{S}] = [\text{K}] k_{\text{SK}} \frac{\text{S.pa}}{\text{K.pa}}$$

wobei S.pa und K.pa die Peakintegrale der Elemente Schwefel und Kalium sind. Kombiniert man Gleichungen 3-17 bis 3-20, erhält man eine Bestimmungsgleichung für die Kaliumkonzentration in Abhängigkeit vom Peakverhältnis von Schwefel und Kalium (Gleichung 3-21):

$$(3-21) \quad [\text{K}] = \frac{[\text{S}]_{\text{Alb}}}{[\text{S}]_{\text{Alb}} \frac{A_{\text{KCl}}}{10^6} + \frac{\text{S.pa}}{\text{K.pa}} k_{\text{SK}}}$$

Eine Entwicklung von Gleichung 3-21 in eine Taylorreihe um den Punkt  $\text{S.pa}/\text{K.pa}=1/k_{\text{SK}}$  (Schwefel- und Kaliumkonzentration sind in etwa gleich) mit Abbruch nach dem linearen Glied liefert:

$$(3-22) \quad [\text{K}] = \frac{[\text{S}]_{\text{Alb}} \left( [\text{S}]_{\text{Alb}} \frac{A_{\text{KCl}}}{10^6} + 2 \right)}{\left( [\text{S}]_{\text{Alb}} \frac{A_{\text{KCl}}}{10^6} + 1 \right)^2} - \frac{[\text{S}]_{\text{Alb}} k_{\text{SK}}}{\left( [\text{S}]_{\text{Alb}} \frac{A_{\text{KCl}}}{10^6} + 1 \right)^2} \frac{\text{S.pa}}{\text{K.pa}}$$

Vergleicht man nun Gleichung 3-22 mit der in Abbildung 3-6 ermittelten Regressionsgeraden, ergeben sich zwei Gleichungen zur Berechnung von  $[\text{S}]_{\text{Alb}}$  und  $k_{\text{SK}}$ . Aus Gleichung 3-23 lässt sich mit der molaren Masse von KCl  $A_{\text{KCl}}=74.55 \text{ g/mol}$  die Schwefelkonzentration in reinem

Albumin  $[S]_{\text{Alb}}$  ermitteln:

$$(3-23) \quad 1117 = \frac{[S]_{\text{Alb}} \left( [S]_{\text{Alb}} \frac{A_{\text{KCl}}}{10^6} + 2 \right)}{\left( [S]_{\text{Alb}} \frac{A_{\text{KCl}}}{10^6} + 1 \right)^2}$$

Als Lösung der quadratischen Gleichung ergibt sich  $[S]_{\text{Alb}}$  zu  $596 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ . Dieser Wert stimmt gut mit den bei (Shuman *et al.*, 1976) angegebenen Werten von  $590\text{--}605 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  überein.

Verwendet man nun die ermittelte Schwefelkonzentration in Gleichung 3-24, lässt sich der Faktor  $k_{\text{SK}}$  bestimmen:

$$(3-24) \quad -721 = - \frac{[S]_{\text{Alb}} k_{\text{SK}}}{\left( [S]_{\text{Alb}} \frac{A_{\text{KCl}}}{10^6} + 1 \right)^2}$$

Er ergibt sich zu einem Wert von 1.32. Vergleicht man diesen Wert mit dem Verhältnis der Standardfaktoren von Kalium und Schwefel (was dem Cliff-Lorimer-Faktor entspricht) von 1.33 aus Tabelle 3-2, ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung. Das bedeutet, die wesentlichen Schwankungen bei der Bestimmung der Kaliumkonzentration in KCl-Albumin-Standards sind auf die nicht gleichmäßige Durchmischung des Standards zurückzuführen.

Eine perfekte Durchmischung und damit Gleichverteilung der Ionen des zugegebenen Salzes ist nahezu unmöglich, da die Ionen dazu vollständig kovalent an den Matrixmolekülen gebunden werden müssten, um zum Beispiel den Einfluss von unterschiedlichen Dichten zwischen Matrixprotein und Salz zu eliminieren.

### 3.5.3 Mineralische Standards

Um die Probleme mit der unterschiedlichen Güte der Durchmischung bei Standards von Proteinen und Salzen zu umgehen, wurde ein mineralischer Standard untersucht. Wir verwendeten als mineralischen Standard Microline USNM143966 mit einem aus der Literatur gegebenem mittlerem Verhältnis von Kalium zu Calcium von 893:1. Dies entspricht in etwa den Verhältnissen in den von uns untersuchten biologischen Präparaten. Weiterhin sind in diesem Standard Oxide von Aluminium, Natrium, Eisen und Magnesium enthalten. Den größten Anteil mit etwa 64 % macht Siliziumoxid aus.

Der Standard wurde nach der in Kapitel 2.2 beschriebenen Präparation für die Analyse vorbereitet. Die Proben wurde auf  $-110^\circ\text{C}$  gekühlt und mit einem Strahlstrom von 1 nA für 1000 s in einem Messbereich von etwa  $1.2 \times 1.2 \mu\text{m}^2$  untersucht.

Die mittleren Konzentrationen aus 10 Messungen in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$  für die wesentlichsten Elemente mit einem Vergleich der vorgegebenen Konzentrationen aus (Jarosewich *et al.*, 1979) (umgerechnet auf  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ) und dem Verhältnis dieser beiden Konzentrationen sind in Tabelle 3-1 dargestellt.

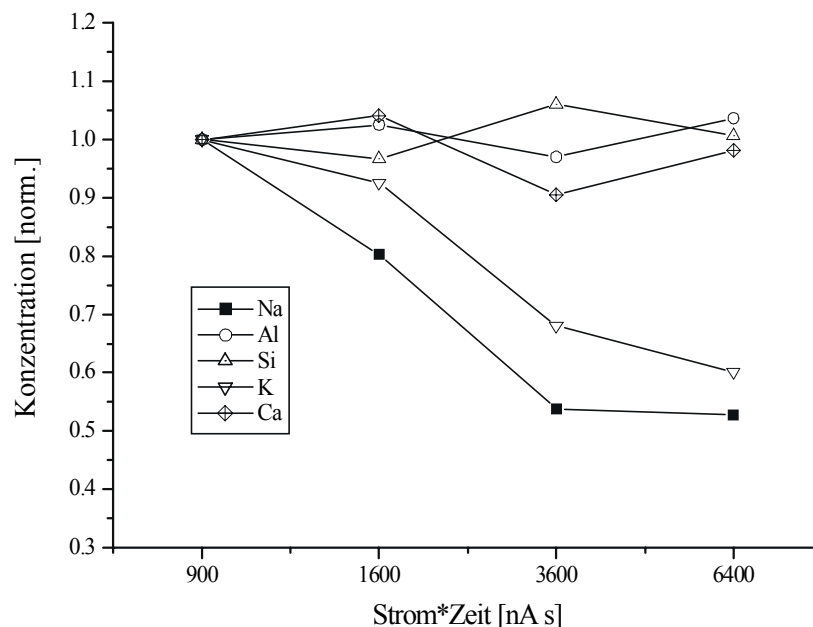
Element	gemessen [mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> ]	Jarosewich et.al [mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> ]	Verhältnis
Natrium	92 ± 19	419	0.22
Aluminium	2348 ± 257	3587	0.65
Silizium	6724 ± 442	10692	0.63
Kalium	874 ± 147	3214	0.27
Calcium	2.5 ± 1.3	3.5	0.71

**Tab. 3-1** gemessene und der Literatur entnommene (Jarosewich *et al.*, 1979) Konzentrationen im mineralischen Standard Microline, sowie die Verhältnisse zwischen gemessenen und Literaturwerten

Wie dem Verhältnis der Konzentrationen zu entnehmen ist, sind die gemessenen Konzentrationen zu klein. Zusätzlich gibt es noch einen Unterschied zwischen den Verhältnissen von Silizium und Aluminium einerseits und Kalium und Natrium andererseits.

Betrachtet man zusätzlich die auf Messzeit und Strahlstrom bezogene Zählrate (gemessen in Counts (s nA)<sup>-1</sup>) für Kohlenstoff in den zu diesen Standardmessungen gehörenden Filmmessungen (Zählrate=13.6±0.3) und den Messungen der Standards selber (Zählrate=44.6±3.6), so unterscheiden sich diese erheblich. Da in dem mineralischen Standard Microline kein Kohlenstoff enthalten ist, müssen die Schnitte noch Teile des Einbettungsmediums Araldit enthalten. Dies wird durch die in den Standards gemessene Chlorkonzentration von etwa 100 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> unterstützt, da zwar Araldit Chlor enthält, aber Microline nicht.

So lässt sich ein Verhältnis der Konzentrationen von kleiner als 1 erklären. Warum es dabei Unterschiede zwischen den einzelnen Elementen gibt, zeigt Abbildung 3-7.



**Abb. 3-7** Verlauf der auf die Konzentration des jeweiligen Elementes bei 900 nAs normierten Konzentrationen der wesentlichen in Microline enthaltenen Elemente in Abhängigkeit von der Elektronendosis pro Messfläche

Dabei sind die relativen Konzentrationen von Natrium, Aluminium, Silizium und Kalium bezogen auf die gemessene Konzentration nach 900 s bei einem Strahlstrom von 1 nA dargestellt.

Deutlich sichtbar ist die mit zunehmender Elektronendosis kleiner werdende Konzentration von Natrium und Kalium. Wahrscheinlich werden diese beiden Elemente bei unseren Messbedingungen aus dem Messbereich entfernt. Dagegen zeigt sich die Konzentration von Silizium und Aluminium stabil und unabhängig vom Energieeintrag in das Messvolumen.

Auf Grund der oben angeführten Tatsachen ist der mineralische Standard Microline unter unseren Messbedingungen nicht zur Bestimmung der Standardfaktoren geeignet.

### 3.5.4 Standardfaktoren

Die Standardmessungen dienen der Bestimmung der zur Analyse nach der Kontinuummethode benötigten Standardfaktoren.

Des Weiteren wurde ein Vergleich mit theoretisch berechneten Verhältnissen durchgeführt. Hierfür wurde Bezug auf das am häufigsten und meist in der höchsten Konzentration vorkommende Element Kalium genommen.

Nach Hall (Hall, 1979a) gilt für die Anzahl der Counts eines charakteristischen Peaks  $Pa_i$  eines Elementes  $i$  folgende Proportionalität:

$$(3-25) \quad Pa_i \propto \omega_i Q_i c_i$$

wobei  $\omega_i$  die Fluoreszenzausbeute des Elementes  $i$ ,  $Q_i$  der Ionisationsquerschnitt des Elementes  $i$  und  $c_i$  die Massenkonzentration des Elementes  $i$  sind. Dies sind die wesentlichen elementspezifischen Proportionalitätsfaktoren, wenn man Absorption in der Probe und im Detektor vernachlässigt bzw. als unabhängig vom Element betrachtet. Mit Bezug auf die Konzentration in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> ergibt sich für den Standardfaktor  $Stf_i$  des Elementes  $i$  folgende Proportionalität:

$$(3-26) \quad Stf_i \propto \omega_i Q_i A_i$$

Für im Vergleich zur Energie der angeregten Strahlung hochenergetische Elektronen ergibt sich der Ionisationsquerschnitt nach Bethe (Scott *et al.*, 1995) zu:

$$(3-27) \quad Q_i = \text{const.} \frac{1}{E_o E_c} \text{Ln} \frac{E_o}{E_c}$$

Bei  $E_o$  handelt es sich um die Energie der in die Probe einfallenden Elektronen, die in unserem Fall bei 100 kV Beschleunigungsspannung 100 keV beträgt. Elektronenenergieverluste sind in den von uns verwendeten dünnen Proben vernachlässigbar, so dass über die gesamte Probendicke näherungsweise mit einer Anregungsenergie von  $E_o$  gerechnet werden kann.

$E_c$  ist die kritische Anregungs- oder Ionisationsenergie. Dies ist eine für das Atom und die betreffende Schale charakteristische Energie, die notwendig ist, um ein Elektron aus dieser Schale auf die erste unbesetzte zu heben (Brümmer, 1977). Es wurden von uns generell die Linien der K-Serie zur quantitativen Auswertung verwendet. Somit ergibt sich für das theoretische Verhältnis der Standardfaktoren des Elementes  $i$  und von Kalium:

$$(3-28) \quad \frac{\text{Stf}_i}{\text{Stf}_K} = \frac{\omega_i A_i E_{cK} \text{Ln} \frac{E_o}{E_{ci}}}{\omega_K A_K E_{ci} \text{Ln} \frac{E_o}{E_{cK}}}$$

Tabelle 3-2 gibt die nach 3-28 berechneten Verhältnisse, die gemessenen Verhältnisse der Standardfaktoren und die wesentlichen Größen zur Charakterisierung der theoretischen Werte der in unseren Proben und Hilfsmitteln (Netze, Filme) enthaltenen Elemente an.

Element	Z	A [g/mol]	$\omega$	$E_C$ [eV]	Stf/Stf <sub>K</sub> theoretisch	Stf/Stf <sub>K</sub> gemessen
Natrium	11	22.990	0.023	1071	0.444	0.41±0.02
Magnesium	12	24.312	0.030	1303	0.482	0.50±0.02
Aluminium	13	26.982	0.040	1560	0.571	0.57±0.01
Silizium	14	28.086	0.050	1840	0.605	0.61±0.03
Phosphor	15	30.974	0.065	2143	0.716	0.74±0.02
Schwefel	16	32.064	0.078	2470	0.743	0.75±0.03
Chlor	17	35.453	0.097	2819	0.863	0.86±0.04
Kalium	19	39.102	0.140	3607	1.000	1.00
Calcium	20	40.080	0.163	4037	1.030	1.06±0.09
Eisen	26	55.847	0.340	7110	1.400	1.42±0.03
Kupfer	29	63.546	0.440	8979	1.489	1.47±0.05

**Tab. 3-2** Gemessene und theoretisch berechnete Standardfaktorenverhältnisse der biologisch interessanten und der in Film, Halter und Netz vorkommenden Elemente, jeweils bezogen auf Kalium.

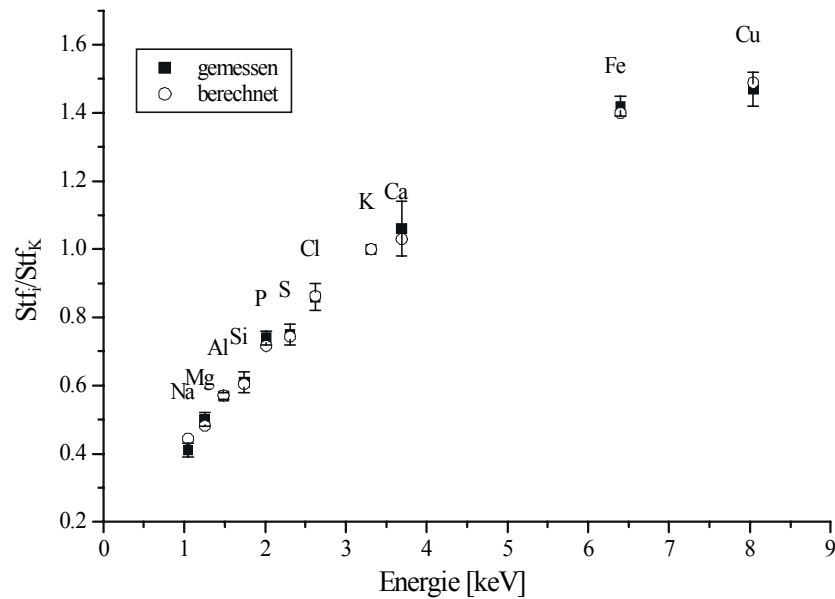
Für  $\omega$  wurden Werte aus (Zschornack, 1989) verwendet. Bei der kritischen Anregungsenergie  $E_c$  der K-Serie wurden Werte aus (Scott *et al.*, 1995) benutzt.

In Abbildung 3-8 sind noch einmal die gemessenen und berechneten Verhältnisse der Standardfaktoren der verschiedenen Elemente  $\text{Stf}_i$  und des Standardfaktors von Kalium  $\text{Stf}_K$  dargestellt.

Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Verhältnissen, die ihre größte Abweichung für Calcium und Natrium aufweist. Für Natrium ist der berechnete Faktor um 8 % zu groß. Für Calcium ist der berechnete Faktor um 3 % zu klein.

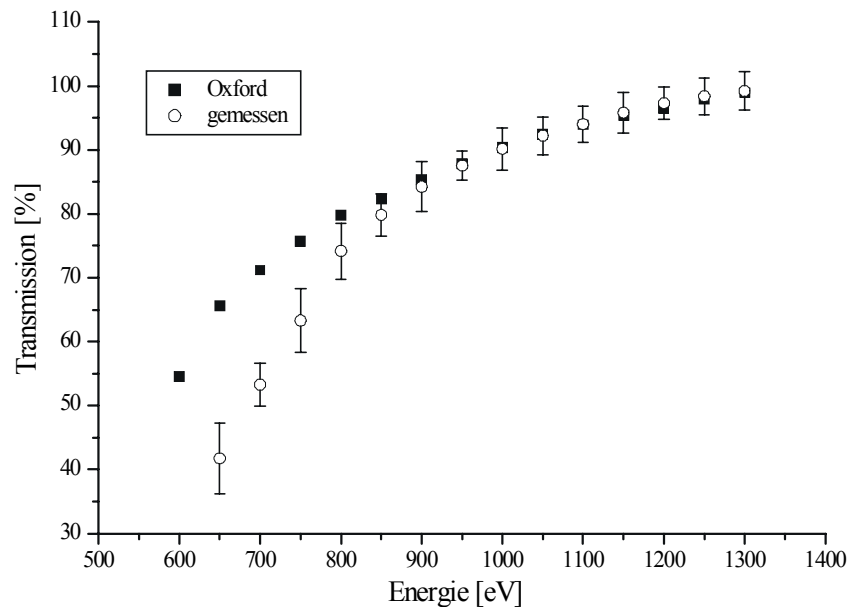
Zur Ermittlung der Standardfaktoren wurden 24 bis 57 Messungen aus gekühlten Proben mit Albumin und Salzen in einer Konzentration von 400-600 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> verwendet. Die für die Calciumstandards verwendeten Salze (wie z.B. CaSO<sub>4</sub>) hatten relative schlechte Löslichkeiten, und es konnten nur Konzentrationen bis etwa 100 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> gelöst werden. Das wirkte sich auch auf die Verteilung des Calciums innerhalb des Albuminstandards aus. So ergab sich für die Messungen zur Bestimmung des Calciumstandardfaktors auch die größte Standardabweichung mit etwa 8 % des Verhältnisses. Bei allen anderen Elementen lagen die Standardabweichungen unterhalb von 5 %.





**Abb. 3-8** Vergleich von berechneten und gemessenen Standardfaktorenverhältnissen für biologisch und messtechnisch interessante Elemente

Für den theoretischen Wert des Natriumstandardfaktors wurde die Absorption am Fenster des Detektors nicht berücksichtigt. In Abbildung 3-9 sind die von Oxford-Instruments angegebene und die von uns gemessene Absorptionskurven dargestellt.



**Abb. 3-9** Vergleich der gemessenen und von Oxford-Instruments angegebenen Absorptionskurven des Detektorfensters; die Fehlerbalken bei den gemessenen Werten stellen die Standardabweichung für N=5 Messungen dar.

Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung im Bereich ab 950 eV. Die gemessene Absorptionskurve wurde aus den Kontinuumverläufen von Messungen an Pioloformfilmen auf Koh-

lenstoffnetzen ermittelt. Die Abweichungen unterhalb 950 eV ergeben sich durch zusätzliche Absorption an im Film enthaltenem Sauerstoff und Kohlenstoff. Für Natrium ergeben sich Transmissionsraten von 92 % für die von Oxford-Instruments gegebene Kurve und 91.8 % für die von uns gemessenen Werte. Dies korreliert sehr gut mit der ermittelten Differenz von 8 % zwischen gemessenen und theoretisch berechneten Standardfaktoren. Diese Differenz wird also im wesentlichen durch die Absorption am Fenster verursacht.

### 3.6 Minimal messbare Konzentration bei Punktanalyse

Bei Punktanalyse ist die minimal messbare Konzentration eines Elementes  $i$  vom untersuchten Probenvolumen abhängig. Dieses wird durch Strahldurchmesser und Probendicke bestimmt. Geht man davon aus, dass sich im zu untersuchenden Probenvolumen  $V$  mit der Masse  $m$  genau ein Atom des Elementes  $i$  befindet, ergibt sich die Konzentration in Masseanteilen zu:

$$(3-29) \quad c_i \left[ \frac{\text{g}}{\text{g}} \right] = \frac{1}{L A_i} \frac{1}{m}$$

wobei  $L$  die Loschmidtsche Zahl und  $A_i$  die molare Masse des Elementes  $i$  ist.  $1/(L A_i)$  ergibt genau die Masse eines Atoms des Elementes  $i$ .

Die Masse des zu untersuchenden Bereiches lässt sich durch die Dichte  $\rho$  und den Strahlradius  $R$  sowie die Schnittdicke  $D$  ausdrücken:

$$(3-30) \quad m = \rho V = \pi \rho R^2 D$$

Dies in Gleichung 3-29 eingefügt, ergibt unter Berücksichtigung der in Biologie und Medizin verwendeten Maßeinheit von mol/kg (zur Umrechnung der verwendeten Konzentrationseinheiten siehe Kapitel 4.7) und der damit verbundenen Umrechnung über die molare Masse  $A_i$  die minimal messbare Konzentration des Elementes  $i$ :

$$(3-31) \quad c_i \left[ \frac{\text{mol}}{\text{kg}} \right] = \frac{1}{L \pi \rho R^2 D}$$

Für einen Strahlradius von  $R = 8 \text{ nm}$  und eine Schnittdicke von  $D=100 \text{ nm}$ , sowie eine Dichte von  $\rho=1 \text{ g/cm}^3$  ergibt sich z.B. eine Konzentration von  $c_i=0.08 \text{ mmol/kg}$  ( $L = 6 \cdot 10^{23}$ ).

### 3.7 Einfacher Test zur Abschätzung der Signifikanz

Als einfachste Möglichkeit zum Abschätzen der zulässigen Fehler der bestimmten Mittelwerte zweier Messreihen  $X_1$  und  $X_2$ , um noch einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte nachweisen zu können, kann der Zweistichproben-t-Test nach Student für unabhängige Zufallsstichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten verwendet werden (Sachs, 1999).

Die Testgröße T bestimmt sich dabei aus:

$$(3-32) \quad T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

Zur weiteren Vereinfachung wird vorausgesetzt, dass die beiden Messreihen mit dem gleichen Fehler behaftet sind (hierbei die Schätzungen  $s_1^2$  und  $s_2^2$  die Varianzen  $\sigma_1^2$  und  $\sigma_2^2$  repräsentieren) und die Anzahl der Realisierungen (Messungen) ebenfalls gleich ist, also:  $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma$  und  $n_1 = n_2 = n$ .

Aus der Gleichung für den t-Test zur Bestimmung der Testgröße T ergibt sich dann unter oben genannten Voraussetzungen mit  $\Delta X$  als Differenz der Mittelwerte der zwei Messreihen folgende Bestimmungsgleichung für T in Abhängigkeit von n und  $\sigma$ :

$$(3-33) \quad T = \frac{\Delta X}{\sigma} \sqrt{n}$$

Um nun Signifikanz zu erhalten, muss die bestimmte Testgröße T größer als der zur Verteilung gehörende t-Wert, welcher eine Funktion des Signifikanzniveaus  $\alpha$  und des Freiheitsgrades m ist, sein:

$$(3-34) \quad T > t(\alpha, m) \quad \text{mit} \quad m = 2n - 2$$

Für  $\alpha = 0.05$  ergibt sich z.B. für  $m = 10$   $t = 2.228$ ;  $m = 20$   $t = 2.086$ ;  $m = 30$   $t = 2.042$  und somit als Näherung für  $n > 10$   $t = 2$ . Damit folgt aus Gleichung 3-32 und Gleichung 3-33 eine Gleichung zum Abschätzen der für eine Signifikanz notwendigen Messgenauigkeit  $\sigma$  bei vorgegebener Differenz der Mittelwerte  $\Delta X$  und Anzahl der Messungen n:

$$(3-35) \quad \sigma = \frac{\Delta X}{2} \sqrt{n}$$

Setzt man im übrigen die Werte der in der Einleitung erwähnten Arbeit von Keller (Keller *et al.*, 1997) in Gleichung 3-32 ein ( $6.2 \pm 0.6$  mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> bei 108 Messungen;  $4.5 \pm 0.4$  mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> bei 144 Messungen, Fehlerangabe Standarderror des Mittelwertes SEM), ergibt sich für  $T = 2.44$  und damit ein signifikanter Unterschied für gewähltes  $\alpha$  größer als 0.0152.

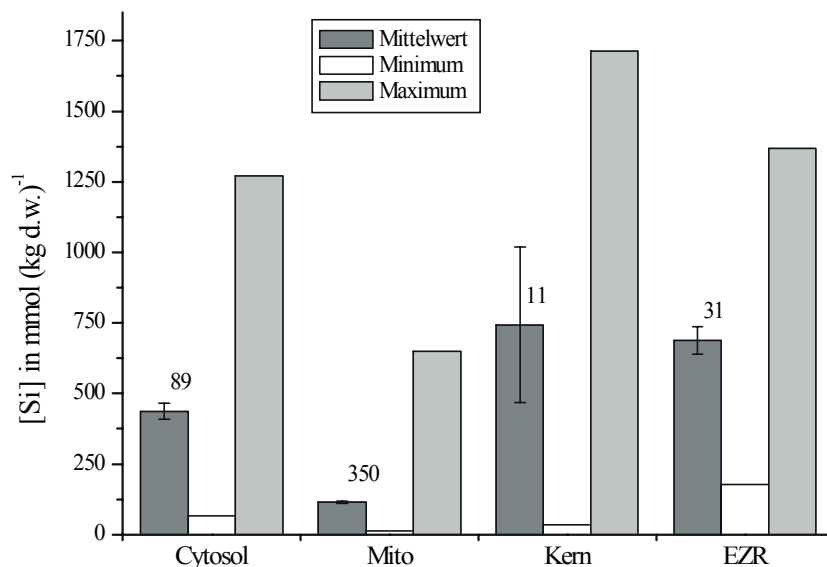
## 4 Einfluss von Fehlern bei Präparation und Messung

### 4.1 Siliziumkontamination

#### 4.1.1 Größe und Verteilung der Siliziumkontamination

Außer den Korrekturen für zusätzliche Röntgenquanten, die in Netz, Film oder Halter erzeugt werden, sind noch solche zu berücksichtigen, die an nicht zur eigentlichen Messprobe gehörenden Elementen entstanden sind. Dazu gehören Kontaminationen, die im Elektronenmikroskop entstehen können (Hall & Gupta, 1982; Love *et al.*, 1981) und solche, die durch verschiedene Schritte der Probenpräparation verursacht werden.

Eine wesentliche Rolle bei der Untersuchung von gefriergetrockneten Schnitten biologischer Präparate kann z.B. die Kontamination mit Silizium spielen. Diese kann einen erheblichen Einfluss auf die Größe der Messergebnisse haben. Um diesen Einfluss zu quantifizieren und zu korrigieren wurde die Siliziumkonzentration der Proben mit analysiert. Dazu wurde der Gehalt von Silizium in Zellkompartimenten von Ventrikelzellen des Meerschweins, von Standards und von dünnen Trägerfolien (aus Pioloform gewonnen) gemessen.



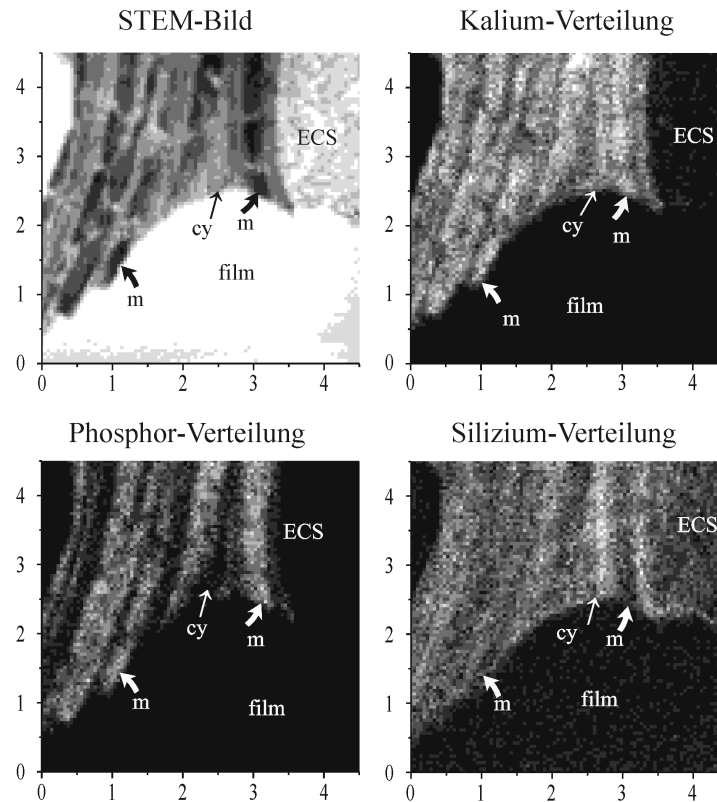
**Abb. 4-1**

Siliziumkonzentration in verschiedenen Kompartimenten von Ventrikelzellen vom Meerschwein. Dargestellt sind Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung sowie die minimale und maximale ermittelte Konzentration. Die Zahlen über den Säulen geben die Anzahl der jeweiligen Messungen an.

Abbildung 4-1 zeigt, dass die Siliziumkonzentration für die unterschiedlichen Zellkompartimente nicht gleich ist. Die kleinste Konzentration ergibt sich für Messungen in den Mitochondrien und die größte für Messungen am Kern. Dabei ist der Unterschied zwischen den einzelnen Messungen am gleichen Kompartiment sehr groß. Deshalb sind in Abbildung 4-1 zusätzlich zu den Mittelwerten der Siliziumkonzentrationen und deren Standardfehler noch die Minimal- und Maximalwerte aufgetragen.

Der Bereich der in gefriergetrockneten Ventrikelzellen des Meerschweins bestimmten Silizi-

umkonzentration reicht von  $13 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bis  $1712 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ .



**Abb. 4-2** Elektronenbild und Verteilung von Kalium, Phosphor und Silizium in einem Schnitt einer Ventrikelzelle des Meerschweins; m- Mitochondrien, cy- Cytosol, ECS- Extrazellarraum (engl.: extra cellular space; Tyrodelösung), film- Pioloformfilm

Die Verteilungsbilder für Silizium, Phosphor und Kalium wurden an einem reinen Pioloformfilm und einem Teil einer Ventrikelzelle vom Meerschwein aufgenommen. Die Pixel stellen dabei die Nettoanzahl der detektierten Quanten des Elementpeaks (Peakintegral, nicht die Konzentration) dar. Für Phosphor zeigt sich ein der Morphologie entsprechendes Bild mit hohem Phosphoranteil in den Mitochondrien und keinem Phosphor im ECS. Bei Kalium ist die leicht erhöhte Anzahl in den Mitochondrien auf eine höhere Massendicke (kleineren Wassergehalt) zurückzuführen. Bei einer homogenen Kontamination mit Silizium würde man eine Gleichverteilung der Nettoquantenzahl über das gesamte Bild erwarten, da diese nur der absoluten Atomzahl des Elementes im untersuchten Volumenbereich proportional ist.

Allerdings zeigt sich, dass in den Zellkompartimenten wie Mitochondrien und Cytosol die Nettoquantenzahl für Silizium wesentlich höher als in den Folienbereichen ohne Zelle ist. Das bedeutet, dass in den Zellbereichen mehr Siliziumatome pro Volumenelement vorhanden sind als in den Bereichen des Films und dass es in den Zellbereichen zu einer Anreicherung gekommen sein muss.

Die Konzentration von Silizium in den Zellkompartimenten ist indirekt proportional zur Trockenmasse des Kompartiments (welche selbst indirekt proportional zum Wassergehalt ist).

Obwohl wir nicht genau wissen, warum Silizium (Si) bzw. Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) sich in verschiedenem Maße in den unterschiedlichen Kompartimenten anreichert, suggerieren die Messergebnisse, dass das Ausmaß der Siliziumkontamination durch den Wassergehalt vor der

Gefriertrocknung beeinflusst wird.

Wie weitere Messungen zeigten, waren auch die unterstützenden Filme und die zum quantifizieren verwendeten Standards mit Silizium kontaminiert. Das heißt, dass die Siliziumkontamination nicht nur ein Problem biologischer Proben ist. Dabei untersuchten wir Pioloformfilme, wie sie routinemäßig in unserem Labor hergestellt werden und verglichen sie mit Formvarfilmen, die wir bei der Firma PLANO (W. Plannet GmbH Elektronenmikroskopie) erworben hatten. Dabei ergaben sich für den Pioloformfilm eine mittlere Siliziumkonzentration von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  und für den Formvarfilm von  $160 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ . Die mittlere Siliziumkonzentration in gefriergetrockneten Standardproben (hier  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Salz mit Dextran und 80 % Wassergehalt vor dem Gefriertrocknen) ist vergleichsweise sehr groß und beträgt etwa  $1000 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ . Die Siliziummessungen an den Filmen suggerieren, dass der größte Teil der Siliziumkontamination während der Herstellung der mit Filmen belegten Netze vor sich geht und es dann während der Gefriertrocknung nur zu Anreicherungen und Umverteilungen kommt. In der Umgebungsluft kommt Silizium hauptsächlich in der Form von Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) vor. Zusätzliche Siliziumkontamination in der Mikroskopsäule ist wahrscheinlich vernachlässigbar, da zur Erzeugung des Vakuums nur Pumpen mit siliziumfreien Öl verwendet werden.

Weitere Kontaminationen durch Sauerstoff aus freiem Wasser, Kohlenwasserstoffe und verdampftes Probenmaterial kann nicht ausgeschlossen werden, lässt sich aber nicht separat ermitteln.

Als beste Näherung legen wir deshalb für analytische Korrekturen fest, dass die hauptsächliche Siliziumkontamination in Form von  $\text{SiO}_2$  auftritt.

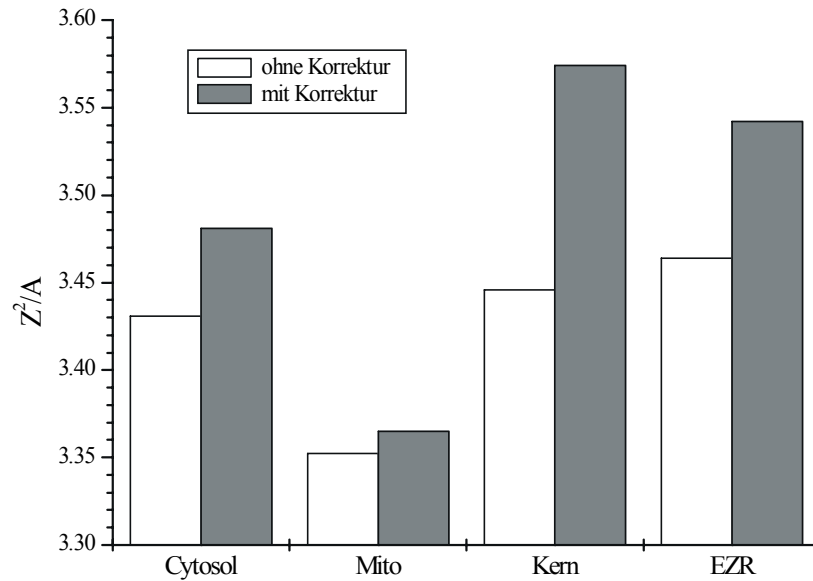
#### 4.1.2 Korrektur der Siliziumkontamination

Zur quantitativen Bestimmung der Elementkonzentrationen in biologischen gefriergetrockneten Schnitten wird die Kontinuummethode nach Hall verwendet (Kapitel 3.4).

Bei der quantitativen Analyse von dünnen biologischen gefriergetrockneten Schnitten mit der Kontinuummethode muss der Einfluss von Röntgenquanten, die vom Probenhalter, dem unterstützenden Film und dem Probennetz ausgehen, korrigiert werden. Des Weiteren werden die berechneten Konzentrationen durch Kontaminationen während der Präparation und der Analyse beeinflusst. Im Falle der Kontamination mit  $\text{SiO}_2$  ist das unkorrigierte Kontinuum  $W_u$  als Summe der Kontinuumbeiträge von Probe (z.B. Herzmuskelzelle), Film, Probennetz, Halter und  $\text{SiO}_2$ -Kontamination aufzufassen.

Wenn der Siliziumpeak einfach abgeschnitten und damit die Siliziumkonzentration ignoriert wird, wird der Kontinuumbeitrag des Siliziumdioxids nicht berücksichtigt und die berechnete Konzentration  $c_i$  des Elementes  $i$  aus der Gleichung 3-11 ohne Siliziumkorrektur ist zu klein, da der in der Gleichung verwendete Kontinuumbeitrag zu groß ist. Als ein zusätzlicher Effekt wird der Beitrag der organischen Matrix (in biologischen Schnitten hauptsächlich Proteine bestehend aus H, C, N und O) zur iterativen Bestimmung des Mittelwertes von  $Z^2/A$  überschätzt und erniedrigt diesen Mittelwert (Abbildung 4-3).

Das führt zu einer weiteren Verkleinerung der berechneten Elementkonzentration  $c_i$ . Wird Silizium bei der Berechnung der Konzentrationen als Probenelement einbezogen, kann der Mittelwert von  $Z^2/A$  exakt bestimmt werden.



**Abb. 4-3** Einfluss der Siliziumkorrektur auf die Bestimmung des Mittelwertes von  $Z^2/A$ . Vergleich der Werte mit und ohne Korrekturrechnung.

Die Elementkonzentration  $c_i^*$  (berechnet mit Gleichung 3-11) ist nun die exakte Konzentration im aus Probe und Kontaminationsschicht bestehenden Volumen. Die exakte Konzentration  $\hat{c}_i$  des Elementes  $i$  in der Probe allein ergibt sich dann aus:

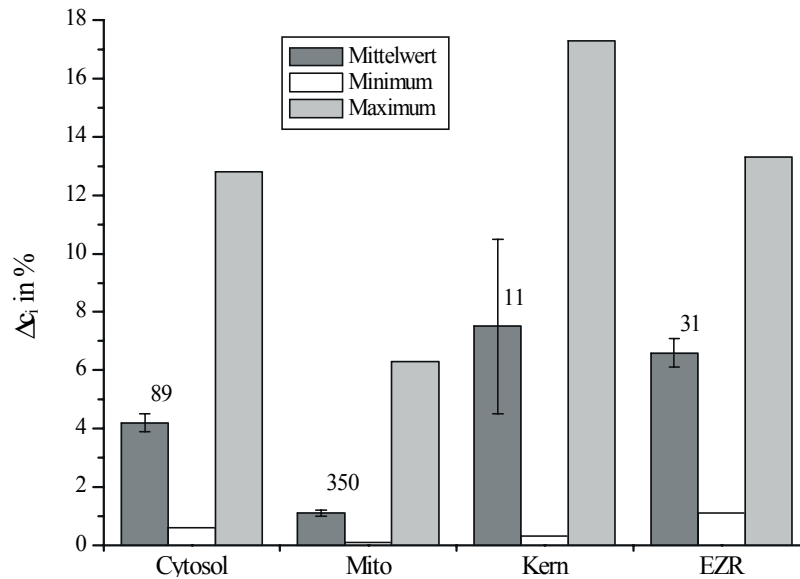
$$(4-1) \quad \hat{c}_i = \frac{c_i^*}{1 - [\text{Si}] A_{\text{SiO}_2}}$$

mit  $[\text{Si}]$  als Siliziumkonzentration im analysierten Bereich und  $A_{\text{SiO}_2}$  als dem Molekulargewicht von  $\text{SiO}_2$  ( $60 \text{ g mol}^{-1}$ ). Mit Gleichung 4-2 können wir nun bestimmen, wie groß der Einfluss der Korrektur für die Siliziumkontamination auf die Bestimmung der Elementkonzentration ist.

$$(4-2) \quad \Delta c_i = \frac{\hat{c}_i - c_i^*}{\hat{c}_i} 100\%$$

Die Resultate der Anwendung von Gleichung 4-2 für die Korrektur der Siliziumkontamination zeigt Abbildung 4-4.

Der Fehler in der Quantifizierung der Elementkonzentrationen ohne Berücksichtigung der Siliziumkorrektur ist für Messungen in Mitochondrien vernachlässigbar. Aber für Messungen im Kern oder Cytosol kann die Abweichung mehr als 10 % betragen.

**Abb. 4-4**

Einfluss der Siliziumkorrektur auf die Elementkonzentration in verschiedenen Kompartimenten von Ventrikeldmyozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der prozentualen Unterschiede zwischen Konzentrationen mit und ohne Korrekturrechnung für Silizium. Zusätzlich dargestellt sind die kleinste und die größte bei der Korrekturrechnung aufgetretene Abweichung. Die Zahlen über den Säulen geben die Anzahl der jeweiligen Messungen an.

#### 4.1.3 Ursache der Siliziumkontamination

Da in unserem Labor seit Ende 1995 ein neuer energiedispersiver Germaniumdetektor (Oxford Instruments) mit verbesserter Auflösung und ultradünnem Fenster statt des sonst gebräuchlichen Silizium-Detektors verwendet wird (Schultz & Wendt-Gallitelli, 1998), konnte der Detektorkristall als Ursache ausgeschlossen werden.

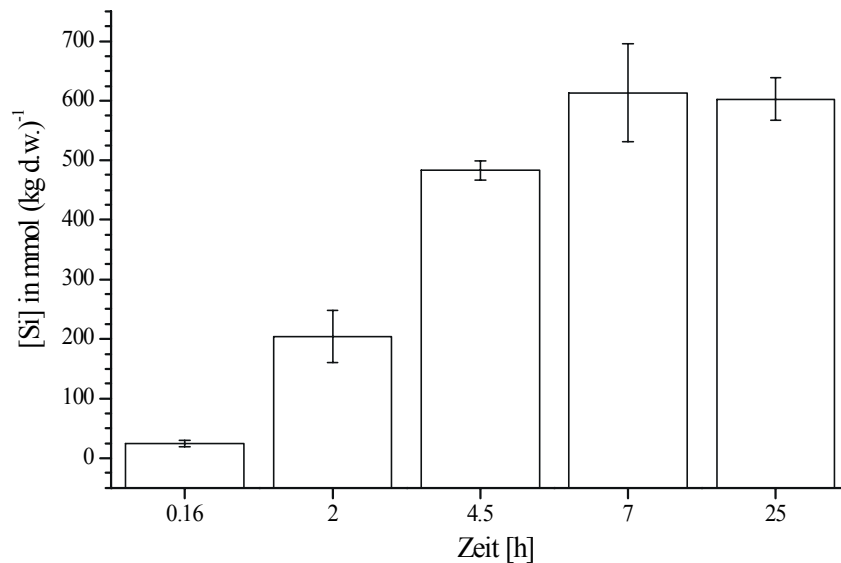
Es wurden also Untersuchungen zu den verschiedenen Schritten der Präparation durchgeführt, da die Kontamination ebenfalls nicht am Probenmaterial liegen konnte, denn sowohl biologische Präparate, als auch Standards waren von der Kontamination betroffen.

Im ersten Schritt wurden außer den nach Laborstandard präparierten Standardproben (siehe Kapitel 2.2) solche untersucht, die sich auf nichtbefilmten Netzen (allerdings engerer Maschenweite, 200 mesh) befanden, sonst aber gleich präpariert (Kryoschneiden und Gefrier-trocknen) waren. Hier ergab sich eine mittlere Siliziumkonzentration von  $975 \pm 52 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bei den Standardproben mit Film im Vergleich zu der vernachlässigbaren Konzentration von  $39 \pm 7 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bei den Standardproben ohne Film. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Ursache der Siliziumkontamination in der Befilmung der Trägernetze zu suchen ist.

Im folgenden wurden außer dem bei uns üblicherweise verwendeten Pioloform als Material zur Filmherstellung, Filme aus Formvar (Firma Sigma-Aldrich) hergestellt. Hier zeigte sich eine vergleichbare Siliziumkontamination im Bereich von etwa  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ . Dies ergab den Schluss, dass die Kontamination ihre Ursache nicht im Material zur Filmherstellung haben konnte.



Dann wurden zur gleichen Zeit befilmte Netze während des Verlaufes des üblicherweise eintägigen Trocknungsprozesses zu verschiedenen Zeiten im Mikroskop analysiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4-5.



**Abb. 4-5** Abhängigkeit der Siliziumkonzentration der mit Parafilmdeckpapier aufgenommenen Piloformfilme von der Trockenzeit. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen für jeweils 6 Messungen.

Im Routinebetrieb wurden die befilmten Netze meist nach einem oder mehreren Tagen benutzt. Die Trocknung und Aufbewahrung der Netze erfolgte standardmäßig in einer Petrischale mit Molekularsieb.

Aus Abbildung 4-5 wird deutlich, dass die Siliziumkontamination mit der Zeit der Trocknung zunimmt und nach einem Tag etwa die Sättigung erreicht hat. Daraus ergab sich die Frage, wo das Silizium während der Trocknung herkommt. Dazu wurden die Netze mit Film mit unterschiedlichen Materialien (Parafilmdeckpapier, Druckerpapier, Aluminiumfolie) vom Wasser aufgenommen.

Nur die nach unserer Standardmethode mit Parafilmdeckpapier aufgenommenen Filme wiesen eine deutliche Siliziumkontamination auf. Als Quelle der Siliziumkontamination konnte also das Parafilmdeckpapier ausgemacht werden.

Mit normalem Druckerpapier aufgenommene und getrocknete Netze wurden dann noch in der Gefriertrocknungsanlage aufbewahrt, dort mit Kohle beschichtet und anschließend im Elektronenmikroskop analysiert. Es zeigte sich keine Siliziumkontamination, so dass zusätzliche Kontaminationen in der Gefriertrocknungsanlage ausgeschlossen werden können.

Allerdings ergaben sich bei Messungen unter Raumtemperatur (Mappings und Linescans) Probleme mit Präparaten ohne Siliziumkontamination. Diese erwiesen sich als wesentlich instabiler und zeigten unter Elektronenbeschuss starke Verschiebungen von Kohlenstoff.

## 4.2 Masseverlust

Die durch den Elektronenstrahl in die Probe eingebrachte Energie führt zu einer Erwärmung dieser und zu Verlust an Material durch Diffusion aus dem analysierten Bereich hinaus oder durch Verdampfen einzelner Elemente bzw. Verbindungen. Die Abhängigkeit des Masseverlustes von der eingebrachten Elektronendosis ist zum Beispiel in (Zierold, 1988) und in (Lamvik, 1991) ausführlich beschrieben.

Messungen des Probenstroms in den bei uns verwendeten Einstellungen ergaben Stromgrößen von etwa 3.5 nA. Bei Messbereichen von etwa 0.01  $\mu\text{m}^2$  in Mitochondrien bis etwa 0.35  $\mu\text{m}^2$  im Cytosol ergibt sich somit eine Elektronendosis im Bereich von  $5 \cdot 10^4 \text{ e}^- (\text{nm}^2 \text{ s})^{-1}$  bis etwa  $2 \cdot 10^6 \text{ e}^- (\text{nm}^2 \text{ s})^{-1}$ .

Ein Masseverlust von vor allem Matrixelementen wie Wasserstoff und Sauerstoff oder Elementen, die nicht in der aktuellen Fragestellung interessieren, führt zu einer Erhöhung des Anteils der untersuchten Elemente und damit zu einer Konzentrationserhöhung für diese.

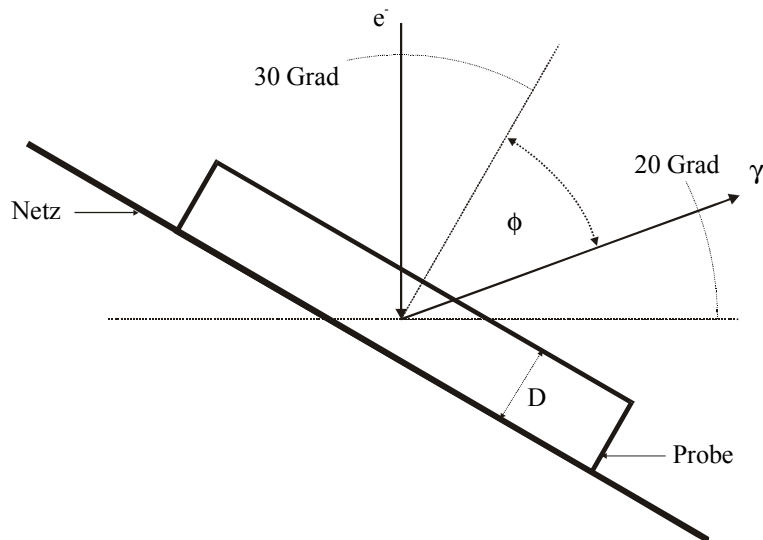
Um dieses Problem zu umgehen, werden die Proben im gekühlten Zustand bei etwa  $-110^\circ\text{C}$  untersucht.

Messungen von dosisabhängigen Konzentrationsverläufen sind für biologische Proben im Kapitel 6.1 dargestellt und erläutert.

## 4.3 Absorptionskorrektur

Beim Beschuss mit beschleunigten Elektronen im Messvolumen entstandene Röntgenquanten können bei ihrem Durchgang durch die Probe wieder mit den Atomen des Messpräparates wechselwirken. Es kommt dabei zu Intensitätsverlusten des Röntgenstrahls durch Absorption und Streuung. Dabei können die Röntgenquanten bei ihrer Absorption durch den Photoeffekt neue Röntgenquanten geringerer Energie anregen (sekundäre Fluoreszenz) (Brümmer, 1977). Diese Absorption ist wesentlich von der Dicke der Probe und ihrer Elementzusammensetzung abhängig. Dabei nimmt sie mit zunehmender Dicke und vergrößertem Anteil schwerer Elemente zu und ist für niederenergetische Röntgenquanten größer als für Röntgenquanten höherer Energie. Bei der Streuung unterscheidet man elastische Streuung an den Elektronen des Probenmaterials mit einer Richtungsänderung ohne Frequenzänderung und Compton-Streuung mit einer zusätzlichen Energieverminderung der Röntgenstrahlung.

Eine einfache Absorptionskorrektur bzw. eine Abschätzung des Einflusses der Absorption und Streuung der Röntgenstrahlung in der Probe ist möglich, wenn man die Massendicke ( $\rho D$ ) nach Gleichung 4-10 ermittelt hat und außerdem den mittleren Massenschwächungskoeffizient der Probe  $\mu$  sowie den Austrittswinkel der Röntgenstrahlung zwischen Detektor und Probe  $\phi$  kennt. In Abbildung 4-6 sind die geometrischen Verhältnisse zwischen Strahl, Probe und Detektor dargestellt.



**Abb. 4-6** Geometrische Verhältnisse zwischen Probe, Detektor und Elektronenstrahl unter Standardmessbedingungen ( $e^-$  - einfallender Elektronenstrahl,  $\gamma$  - in Richtung Detektor aus der Probe austretende Röntgenstrahlung)

Nimmt man an, dass die Entstehung der primären Röntgenstrahlung  $I(\rho dz)$  im Massendickenelement  $\rho dz$  über die gesamte Probendicke  $D$  konstant ist:

$$(4-3) \quad I(\rho dz) = I_0 \frac{dz}{D}$$

und integriert über das Schwächungsgesetz nach Gleichung (4-4):

$$(4-4) \quad I_{\text{mess}} = \int_0^D I_0 \frac{dz}{D} \exp(-\mu \rho z \operatorname{cosec} \phi)$$

ergibt sich der Korrekturfaktor der Absorptionskorrektur  $K_{\text{abs}}$  aus:

$$(4-5) \quad K_{\text{abs}} = \frac{1 - \exp(-\mu \rho D \operatorname{cosec} \phi)}{\mu \rho D \operatorname{cosec} \phi}$$

und die korrigierte Intensität  $I_0$  aus der gemessenen Intensität  $I_{\text{mess}}$  nach:

$$(4-6) \quad I_0 = \frac{I_{\text{mess}}}{K_{\text{abs}}}$$

Für die mittleren Massendicken von  $3.7 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^2$  der Mitochondrien unserer Proben aus Tabelle 4-3 und einen Absorptionskoeffizienten von  $4250 \text{ cm}^2/\text{g}$  für Röntgenquanten der Energie der Natrium- $K\alpha$ -Linie bei ihrem Durchgang durch reinen Sauerstoff (größter Absorptionskoeffizient aller in unseren Proben enthaltenen Elemente) (Zschornack, 1989) lässt sich bei einem Austrittswinkel von etwa  $40^\circ$  abschätzen, dass  $K_{\text{abs}}$  minimal 0.89 und somit die Absorption maximal 11% beträgt. Da aber die Probe zu weniger als 50% aus Sauerstoff besteht und für alle anderen Elemente der Absorptionskoeffizient zum Teil erheblich kleiner ist, liegt der Fehler durch Absorption in der Probe bei der Bestimmung der Natriumkonzentration unter 10%. Bei der gleichen Abschätzung für die Calcium- $K\alpha$ -Strahlung kommt man auf maximal 0.4% Absorption und damit einen vernachlässigbaren Einfluss.

Für den Massendickestandard Makrofol beträgt  $K_{\text{abs}}$  ungefähr 0.974 für Strahlung der Energie 3 keV und 0.998 für Strahlung der Energie 7 keV, so dass Absorptionseffekte bei Berechnung der Werte in Tabelle 4-3 nach Gleichung 4-10 vernachlässigt werden können. Hier wurde der Schwächungskoeffizient  $\mu$  exakt aus der Zusammensetzung der Folie (5.4% Wasserstoff, 74% Kohlenstoff, 18.4% Sauerstoff und 2.2% Aluminium) und den einzelnen Schwächungskoeffizienten der enthaltenen Elemente nach (Zschornack, 1989) berechnet.

#### 4.4 Bestimmung des Probenstroms

Die Bestimmung des Probenstroms ist mit einem speziellen Probenhalter für das Philips CM12 Elektronenmikroskop möglich.

Der von uns verwendete Halter der Firma Gatan (Model 636 DH, Double Tilt LN<sub>2</sub> cooled Specimen Holder) besitzt einen sogenannten Farraday-Käfig (eine Vertiefung in der Halter-spitze) mit Anschluss für ein Picoamperemeter. Wird der Elektronenstrahl in diese Vertiefung gebracht, ist es möglich, den Strahlstrom direkt zu messen.

Dieser lässt sich durch Variation verschiedener Parameter wie Emission (Einstellung der Gegenspannung am Wehnelt-Zylinder), Strahldurchmesser (Spot Size) und Heizstrom beeinflussen.

Bei der von uns maximal bei der Untersuchung von biologischen Proben verwendeten Einstellung (Emission 2, Spot 3), wurde im Mittel nach Justierung des Mikroskops ein Strom von  $3.49 \pm 0.09$  nA ( $\pm$ SD, 15 Messungen mit gleicher Kathode) gemessen.

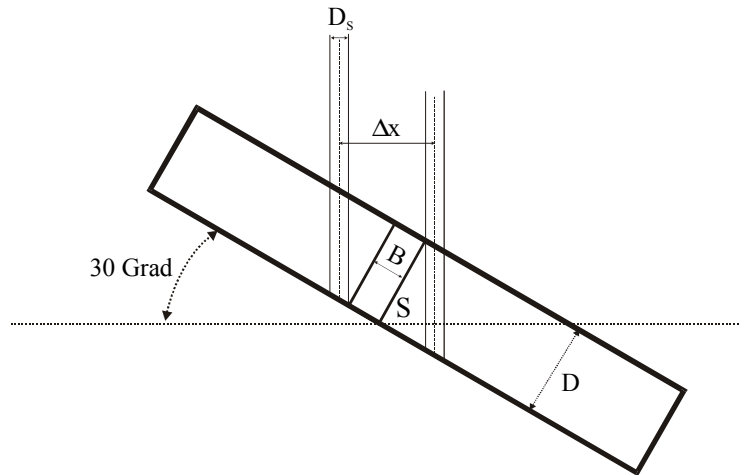
Um die Stabilität des Strahlstromes zu überprüfen, wurde an verschiedenen Messtagen der Strom vor und nach den Messungen ermittelt und die Schwankungen notiert.

Bei ausreichender Anlaufzeit der Kathode (mehr als 4 Stunden), ergaben sich Schwankungen zwischen +2.3 % und -3.9 % des Ausgangswertes. Die mittlere Differenz des Strahlstromes vor und nach der Messung (in der Regel 5-8 Stunden Zeitunterschied) betrug -1.6 % bei N=7 Messungen. Wurden die Messungen bei noch nicht stabilisierter Kathode (Wartezeit < 3 Stunden) begonnen, wurden maximale Stromschwankungen von -17 % gemessen. Die Kathode bewegte sich nach der Justierung während der Messung und der Strahlstrom verringerte sich.

#### 4.5 Probenorientierung/Kippwinkel und Strahldurchmesser

Der Strahldurchmesser ergibt scheinbar kein Problem, solange er kleiner ist als die zu untersuchende Struktur und somit nur Wechselwirkungen in dieser verlaufen. Dies gilt allerdings nur bei senkrechtem Einfall auf die Probe. Da bei diesem aber kaum noch Röntgenquanten am Detektor auftreffen (erhöhte Absorption, siehe Kapitel 4.3), wird unter einem Winkel von 30° eingestrahlt. Das führt dazu, dass der Elektronenstrahl die Probe schräg durchläuft und der eigentliche Probenbereich, der mit dem Elektronenstrahl in Wechselwirkung tritt, eine größere Ausdehnung besitzt.

Bei schmalen senkrecht zur Probenaufgabe verlaufenden Strukturen kann so noch ein Teil des umgebenden Kompartiments mit erfasst werden. In Abbildung 4-7 ist schematisch dargestellt, wie sich die Verhältnisse in solch einer senkrechten Struktur von 2-fachem Strahldurchmesser und einer Probendicke von etwa dem 3-fachem der Ausdehnung der Struktur darstellen.



**Abb. 4-7** Darstellung der Messgeometrie bei senkrechten Strukturen S der Breite B und um 30° gekippten Proben der Dicke D.  $\Delta x$  ist der Bereich, in dem mit dem Elektronenstrahl Teile der Struktur getroffen werden.  $D_s$  ist der Durchmesser des Elektronenstrahls.

Zwischen den beiden eingezeichneten Strahlen kommt es immer zu einer Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Struktur S. Somit enthalten die aufgenommenen Spektren im mit  $\Delta x$  gekennzeichneten Bereich Anteile der Struktur. Hierbei ergibt sich  $\Delta x$  aus:

$$(4-7) \quad \Delta x = D \sin 30^\circ + B \cos 30^\circ + D_s$$

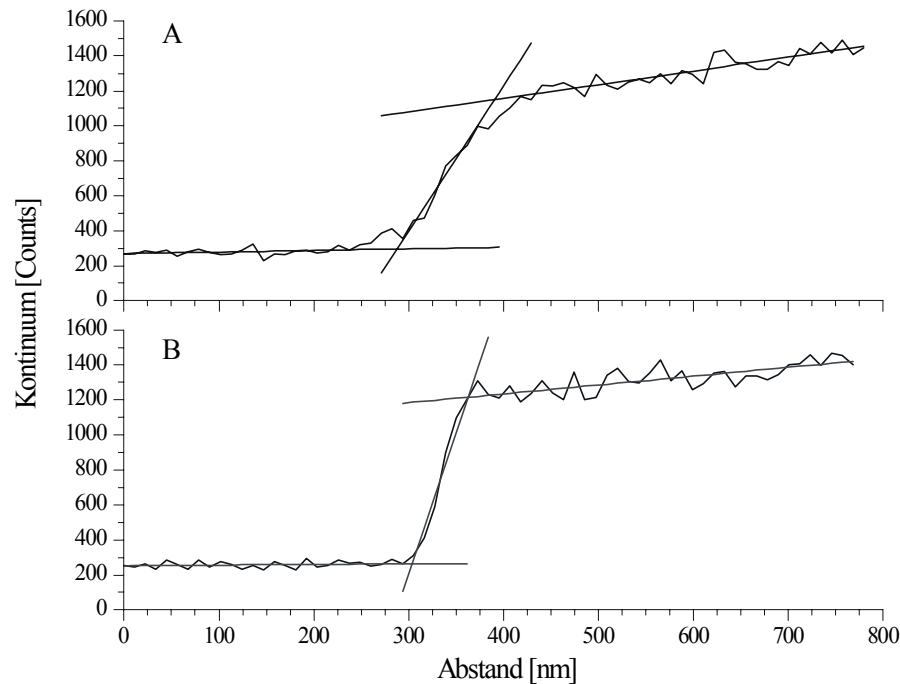
Im konkreten Beispiel wären das für einen Spotdurchmesser von 16 nm, eine Struktur von 30 nm und eine Probendicke von etwa 100 nm ein Bereich von 92 nm. Hierbei reicht der Anteil der Struktur am gesamten vom Elektronenstrahl erfassten Volumen von >0% bis zu einem maximalen Anteil von  $2 \cdot B \cdot D_s / (D / \sin 60^\circ + D_s)$ , was für unser konkretes Beispiel 52% entspricht. Das bedeutet, es werden maximal etwa 50% der Strahlung aus der untersuchten Struktur und damit mindestens 50% der Strahlung aus den benachbarten Kompartimenten emittiert. Dies kann eine der Hauptursachen für die großen Standardabweichungen in der Arbeit von (Keller *et al.*, 1997) bei Untersuchungen am sarkoplasmatischen Retikulum sein, da es sich beim sarkoplasmatischen Retikulum um dünne Membranschläuche und Membranvesikel von etwa 20 nm Durchmesser handelt.

Aus diesem Grunde ist bei Messungen in kleineren Zellkompartimenten und in Randbereichen der Zelle oder von Zellkompartimenten darauf zu achten, dass bei einem Strahldurchmesser von 16 nm und einer Probendicke von etwa 100 nm mindestens ein Abstand des Messbereiches von 90 nm zur nächsten Struktur gewählt wird, um sicher zu gehen, dass die Wechselwirkung mit dem Elektronenstrahl nur im zu untersuchenden Kompartiment abläuft.

So kann es bei Linienmessungen (Linescans) über Kanten, wie zum Beispiel dem Übergang von der extrazellulären Lösung zur Zellmembran, zur Verwischung der Konzentrationsunterschiede kommen. Des Weiteren werden dadurch die Strukturen in ihrer Ausdehnung verbreitert bestimmt. So zeigt Grafik A in Abbildung 4-8 eine deutliche Verbreiterung der Kante beim Übergang vom reinen Film zu einem 95 nm dicken Aralditschnitt. Hierbei verlief der Linescan durch die Probe senkrecht zur Kippachse des Halters, was eine maximale Verbreiterung analog zur Abbildung 4-7 bedeutet. Es ergibt sich eine scheinbare Kantenbreite von 103 nm. Bei einer genau senkrecht verlaufenden Kante mit der Dicke der Struktur S von  $B=0$

würde sich nach Gleichung 4-7 für einen Spot von 16 nm eine Verbreiterung auf 64 nm ergeben. Allerdings sind die Kanten bei diesen Schnitten meist leicht schräg bzw. abgerundet, was man dem im Verlauf des Schnittes noch ansteigenden Kontinuum entnehmen kann.

Welche Rolle die Orientierung der Probe zur Kippachse spielt, verdeutlicht der Vergleich mit Grafik B von Abbildung 4-8. Hier erfolgte der Linescan über den gleichen Probenbereich, aber mit einer Orientierung der Scanrichtung parallel zur Kippachse. Hier reduziert sich die gemessene Kantenbreite auf 59 nm. Die theoretische Breite für eine Struktur der Ausdehnung  $B=0$  wäre die Spotbreite 16 nm. In A und B ergibt sich die gleiche Differenz zwischen theoretischer und gemessener Kantenausdehnung, was in der Form der Kante begründet ist.



**Abb. 4-8**

Linescan über die Kante eines 95 nm dicken Aralditschnittes. Dargestellt ist die Größe des Kontinuums. Es wurden alle 10 nm mit einem Spot von 16 nm für 30 s Spektren gesammelt und analysiert. A: Scanrichtung durch die Probe senkrecht zur Kippachse des Probenhalters. B: Scanrichtung parallel zur Kippachse des Probenhalters.

Kritisch sind in dieser Hinsicht auch Messungen in der Nähe des Extrazellularraumes zu betrachten. Die Lösung, in der sich die Ventrikelmyozyten zum Zeitpunkt des Einfrierens befinden, enthält ebenfalls alle in der Zelle vorkommenden Ionen, nur in anderer Zusammensetzung. Werden nun durch den Strahl auch Bereiche des Extrazellularraumes erfasst, kann es zur Vortäuschung von Veränderungen der Elementkonzentrationen in Membrannähe kommen.

Die Tabellen 4-1 und 4-2 geben Beispiele für verschiedene Überlappungsanteile des Extrazellularraums an der Gesamtmessung bei Verwendung der in Kapitel 2.1 beschriebenen Lösung im Extrazellularraum unter Voraussetzung der Beibehaltung der Mischungsverhältnisse mit Albumin in dieser Lösung. Dabei wird von den aus allen Messungen an Ventrikelmyozyten der Ratte (SHR und WKY) berechneten Mittelwerten für zentrale (im Zellinneren gelegene) Kompartimente (Cytosol und Mitochondrien) der Zelle ausgegangen.

Element	Cytosol	Extrazellular	bei 5 % Ül.	bei 10 % Ül.	bei 25 % Ül.
Natrium	78.7	910.0	120.3	161.8	286.5
Magnesium	64.4	7.3	61.5	58.7	50.1
Phosphor	257.6	0.0	244.7	231.8	193.2
Chlor	221.5	969.0	258.9	296.3	408.4
Kalium	720.3	32.8	685.9	651.6	548.4
Calcium	2.7	10.9	3.1	3.5	4.8

**Tab. 4-1** Abweichungen der Konzentrationen durch extrazelluläre Überlagerungen verschiedener Größe (5, 10, 25 % Ül. – Überlagerung) für das Kompartiment Cytosol (311 Messungen), alle Konzentrationsangaben in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup>

Element	Mito	Extrazellular	bei 5 % Ül.	bei 10 % Ül.	bei 25 % Ül.
Natrium	30.6	910.0	74.6	118.5	250.5
Magnesium	31.9	7.3	30.7	29.4	25.8
Phosphor	447.7	0.0	425.3	402.9	335.8
Chlor	89.5	969.0	133.5	177.5	309.4
Kalium	358.0	32.8	341.7	325.5	276.7
Calcium	0.4	10.9	0.9	1.4	3.0

**Tab. 4-2** Abweichungen der Konzentrationen durch extrazelluläre Überlagerungen verschiedener Größe (5, 10, 25 % Ül. – Überlagerung) für das Kompartiment Mitochondrien (319 Messungen), alle Konzentrationsangaben in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup>

Wie oben gezeigt, spielt die Orientierung zwischen Probe und Strahl eine große Rolle für die Überlappung. Daher sollte gerade bei Messungen an membrannahen Strukturen auf den Verlauf der Membran in Bezug auf Kippachse geachtet werden.

Unter bestimmten Versuchsbedingungen, wenn z.B. Teile des Albumins aus der extrazellulären Lösung ausgefallen sind, kann es zu einer Erhöhung der Elementkonzentrationen im Extrazellularraum und damit zu größeren Abweichungen bei geringeren Überlappungsgraden kommen.

Oft ist allerdings die gefriergetrocknete Lösung auf Grund der im Vergleich zur Zelle unterschiedlichen Dichte beim Schneiden abgefallen und es besteht keine Möglichkeit der Überlappung mit dem Extrazellularraum. Ist in solch einem Fall die Membran gut zu identifizieren, sind membrannahe Messungen ohne Bedenken hinsichtlich möglicher Überlappungseffekte durchführbar.

#### 4.6 Probenbeschichtung

Die Probenbeschichtung mit Kohle (etwa 3 nm pro Beschichtung, 2 mal pro Präparation durchgeführt) dient dazu, die elektrische Leitfähigkeit des Netzes und dort vor allem des Pioloformfilms zu erhöhen und damit Aufladungen während der Messung zu vermeiden. Zusätzlich dient die Schicht zur besseren Ableitung der entstehenden Wärme. Es erfolgt jeweils eine Beschichtung der Filme ohne Probe vor dem Kryoschneiden und eine Beschichtung nach der Gefrierdrying. Die Messungen der Schichtdicken wurden mit einem Schwingquarzmesser

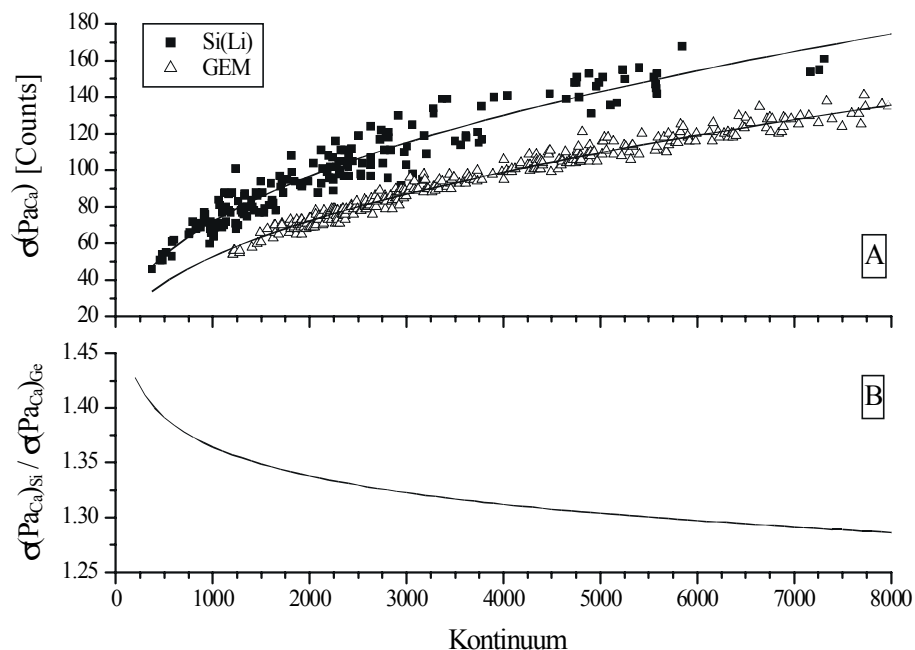
durchgeführt.

Die Kohleschicht führt zu einer Erhöhung der Kohlenstoffkonzentration. Dies wirkt sich auf die Konzentration der anderen Elemente über einen zusätzlichen Kontinuumbeitrag erniedrigend aus.

Geht man davon aus, dass die Kohleschicht auf dem Film und der Probe gleich groß ist, kann man die Kohleschicht als Teil des Films betrachten. Das bedeutet, dass in der Filmkorrektur die Korrektur für die Probenbeschichtung bereits enthalten ist.

#### 4.7 Einfluss der Energieauflösung des EDS-Detektors

Ausführliche Informationen über den Einfluss der Detektorauflösung auf die mathematische Analyse der gemessenen Spektren finden sich bei Statham (Statham, 1995), der dabei vor allem auf den Einfluss auf die Entfaltung sich überlappender charakteristischer Peaks eingeht. In (Schultz *et al.*, 1999) wird am praktischen Beispiel von Messungen an Ventrikelmiozyten gezeigt, wie eine Verbesserung der Auflösung durch Verwendung eines Germaniumdetektors mit einer FWHM von 120 eV bei  $Mn_{K\alpha}$  gegenüber einem vorher verwendeten Siliziumdetektor mit einer Auflösung von 141 eV die Bestimmung der Calciumkonzentration verbessert. In Abbildung 4-9 ist das wesentliche Ergebnis noch einmal dargestellt.



**Abb. 4-9** A. Zusammenhang zwischen Kontinuum und Fehler bei der Bestimmung des Peakintegrals von Calcium ( $\sigma(Pa_{Ca})$ ) für Si(Li)-Detektor und Germaniumdetektor (GEM)  
B. Abhängigkeit des Verhältnisses der Fehler bei Si(Li)- und GEM-Detektor vom Kontinuum

Für großes Kontinuum (niedriges Rauschen) nähert sich das in Abbildung 4-11B dargestellte Verhältnis dem von Statham in oben erwähnter Arbeit für sich überlappende glatte Peaks (ohne Rauschen) vorhergesagten von 1.2.



#### 4.8 Konzentrationseinheiten

Die Anwendung der Kontinuummethode nach Hall liefert die Elementkonzentrationen im analysierten Bereich bei Verwendung geeigneter Maßeinheiten für die Standardfaktoren in  $\text{mmol} (\text{kg d.w.})^{-1}$ . Dabei bedeutet d.w. dry weight, womit die Masse des analysierten Bereiches nach Gefriertrocknung gemeint ist. Das heißt, man bekommt eine Angabe über die Zahl der Atome eines Elementes in Bezug auf das Trockengewicht des analysierten Volumens. Es wird hier davon ausgegangen, dass den Proben das Wasser vollständig während der Gefriertrocknung entzogen wurde.

Bei der Messung mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse werden Anteile aller im Volumen enthaltenen Atome eines Elementes berücksichtigt. Damit ergibt sich also eine totale Konzentration, die sowohl die gebundenen Anteile eines Elementes, als auch die in Lösung befindlichen in Form von Ionen vorliegenden Anteile erfasst.

Je nach Wassergehalt des Zellkompartiments kommt es also bei der Gefriertrocknung zu einer mehr oder minder großen Erhöhung der Elementkonzentration von nicht flüchtigen Elementen. Um ein vergleichbares Ergebnis der Konzentrationen zwischen den einzelnen Kompartimenten zu erhalten, ist eine Umrechnung der Konzentrationsangaben unerlässlich. Hauptsächlich ist diese Umrechnung aber auch notwendig, um die Ergebnisse mit anderen Methoden zu vergleichen (z.B. Ionensensitive Elektroden), welche die Konzentrationen in Teilchenzahl pro Liter Gesamtvolumen (Molarität) oder in Teilchenzahl pro Kilogramm Lösungsmittel (Molarität) bestimmen.

Geht man von einer Dichte der Zelle von  $1 \text{ g/cm}^3$  aus und kennt man den Wasseranteil vor der Gefriertrocknung, ergibt sich die Konzentration in  $\text{mmol l}^{-1}$  Zellvolumen einfach durch Multiplikation mit dem Trockengewichtsanteil  $d$  des Gesamtvolumens:

$$(4-8) \quad c \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] = c \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{kg d.w.}} \right] d$$

Für die Ratte ergeben sich aus unseren Messungen Werte für Mitochondrien von  $d=0.556$  und für das Cytosol von  $d=0.227$ .

Für Vergleiche mit Messungen mittels ionensensitiver Elektroden muss die Konzentration auf das Volumen des freien Wassers bezogen werden (nicht auf das Gesamtvolumen). Dies erhält man dadurch, dass man die Konzentration bezogen auf das Trockengewicht (diese ist unser Messwert aus der Elektronenstrahlmikroanalyse) mit dem Trockengewichtsanteil  $d$  multipliziert und durch den Wasseranteil  $f$  dividiert, wobei gilt:  $1 = d + f$

$$(4-9) \quad c \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{l H}_2\text{O}} \right] = c \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{kg d.w.}} \right] \frac{d}{f}$$

#### 4.9 Massendickeneinfluss

Die Schnittdicke ließe sich zum Beispiel durch ein Tomografieverfahren bestimmen. Das ist sehr aufwendig, und es wird für eine ausreichende Genauigkeit ein hochauflösendes Elektronenmikroskop benötigt.

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung sogenannter Massendicke-Standards. Dabei wird von einem Material bekannter Dicke  $D_S$  und Dichte  $\rho_S$  ausgegangen und dort das Kontinuum  $W_S$  während einer vorgegebenen Zeit  $t_S$  bei bekanntem Strahlstrom  $I_S$  gemessen. Werden nun bei einer Messung in einem Kompartiment der Probe ebenfalls die Zeit  $t_P$ , der Strahlstrom  $I_P$  und das Kontinuum  $W_P$  bestimmt, ergibt sich aus dem Verhältnis nach Gleichung 4-10 die Massendicke des Kompartiments. Zusätzlich muss noch die unterschiedliche Zusammensetzung von Probe und Standard über den Mittelwert von  $Z^2/A$  für Probe (P) und Standard (S) berücksichtigt werden.

$$(4-10) \quad \rho_P D_P = \frac{W_P}{I_P t_P \overline{Z^2/A_P}} \frac{I_S t_S \overline{Z^2/A_S}}{W_S} \rho_S D_S$$

Geht man nun von einer angenommenen Dichte aus, oder ist man in der Lage, die Dichte zu messen, lässt sich die Schnittdicke abschätzen.

Der bei uns verwendete Massendicke-Standard ist eine Aluminium-Kunststoff-Folie (Makrofol, Oxford-Instruments). Die Massendicke wurde von mir durch Bestimmung des Gewichtes und der Fläche der Folie ermittelt. Der Messfehler lag dabei unterhalb 1.5 %. In Tabelle 4-3 sind zusätzlich die Massedicken für verschiedene Proben, berechnet nach Gleichung 4-10, und die Dicken für gemessene Dichten oder angenommene Dichten aufgeführt.

Die in Gleichung 4-10 verwendeten Kontinua  $W_P$  und  $W_S$  wurden jeweils im Energieintervall 3 keV bis 7 keV bestimmt. Dieser Bereich wurde gewählt, da der Aluminiumpeak im Massendicke-Standard sehr groß ist und es deswegen zu Ungenauigkeiten bei der Kontinuumbestimmung im Bereich zwischen 1 keV und 3 keV kommt.

Probe	Massendicke $10^{-4}[\text{g}/\text{cm}^2]$	Anzahl	Dichte $[\text{g}/\text{cm}^3]$	Dicke $[\mu\text{m}]$	Vergleichs- dicke $[\mu\text{m}]$
Makrofol	2.827±0.038	1	-	-	-
Araldit (gold)	0.096±0.010	4	1.01	0.095	0.08-0.13
Araldit (violett)	0.158±0.004	4	1.01	0.156	0.13-0.18
Araldit (blau-grün)	0.246±0.022	3	1.01	0.244	0.18-0.26
Ratte (Mito.)	0.369±0.117	180	1.3*	0.284	0.22 <sup>#</sup>
Ratte (Cytosol)	0.151±0.063	175	1.3*	0.116	0.22 <sup>#</sup>
Albumin 60% H <sub>2</sub> O	0.265±0.065	9	1.28	0.207	0.22 <sup>#</sup>
Albumin 80% H <sub>2</sub> O	0.135±0.039	10	1.28	0.105	0.22 <sup>#</sup>
Pioloform-Film	0.029±0.003	22	1*	0.029	-

**Tab. 4-3** Messergebnisse mit Standardabweichungen (bei Makrofol berechneter Messfehler) und berechnete Werte für Massendicke und Schnittdicke für verschiedene Standards sowie Messungen an Rattenventrikelmyozyten. Die mit \* gekennzeichneten Dichten sind geschätzt, die mit <sup>#</sup> gekennzeichneten Dicken beziehen sich auf voreingestellten Schnittdicken am Ultrakryomikrotom.

Die mit Araldit bezeichneten Proben sind Trockenschnitte eines Aralditblockes mit unterschiedlichen Einstellungen der Schnittdicke am Mikrotom. Die Farben in Klammern entsprechen dabei den durch die Schnittdicke hervorgerufenen Interferenzen. Die dazugehörigen Dickenbereiche sind nach einer Vorlagenschablone ermittelt worden und als Vergleichsdicke eingetragen. Die aus der mit Hilfe von Gleichung 4-10 ermittelten Massendicke und der gemessenen Dichte bestimmten Dicken stimmen sehr gut mit den Vergleichsdicken überein, was für die Anwendbarkeit von Gleichung 4-10 zur Bestimmung der Schnittdicke spricht.

Die mit Albumin und xx% H<sub>2</sub>O bezeichneten Proben sind Albuminstandards mit unterschiedlichem Wassergehalt vor der Gefrierdrying. Diese Standards sind dann mit dem Kryomikrotom geschnitten und gefriergetrocknet worden. Sie zeigen eine wesentlich größere Breite in der Verteilung der Schnittdicken und eine größere Dicke als nach den Voreinstellungen am Mikrotom (für hydratisierte Proben) und anschließender Gefrierdrying zu erwarten war. Das bedeutet, dass die Albuminstandards so wie die Schnitte der Ventrikelmyozyten (Ratte (Mito) und Ratte (Cyto) in Tabelle 4-3) während des Kryoschneidens unterschiedlich stark komprimiert werden. Auf ähnliche Ergebnisse kommen (Shi *et al.*, 1996), die bei Messungen an einem Ultrakryomikrotom gleichen Typs auf Schnittdicken von 1.5- bis 2.5-fachen der voreingestellten Schnittdicke kommen. Vorschläge zur Reduzierung der Kompression beim Kryoschneiden durch Verwendung eines oszillierenden Messers sind in (Studer & Gnaegi, 2000) gegeben.

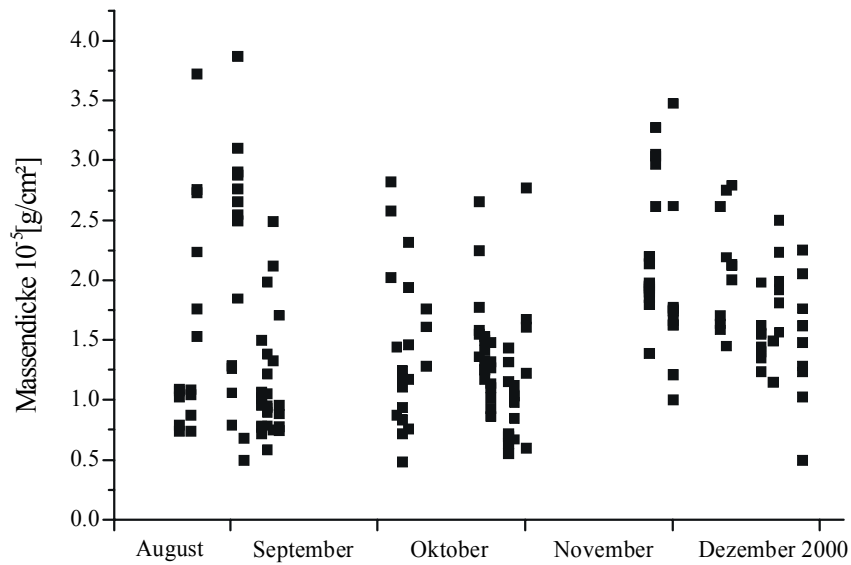
Die von uns verwendeten Filme (Pioloform) haben eine Dicke um die 30 nm mit sehr geringer Streuung.

Die bei den Messungen an Mitochondrien und Cytosol zur Bestimmung der Schnittdicke verwendete Dichte ist ein aus (Zierold, 1988) entnommener Wert für Zellproteine. Diese machen in den gefriergetrockneten Zellschnitten den Hauptteil der Trockenmasse aus.

Die Schnittdicke selbst lässt sich aus der Massendicke nur unter Annahme der Dichte bestimmen. Für Vergleiche und Untersuchungen zu präparations- bzw. funktionell bedingten Schwankungen ist es daher exakter, die Massendicke ( $\rho D$ ) zu betrachten. In Abbildung 4-10 sind für Messungen an Ventrikelmyozyten von Ratten die Massendicken für das Kompartiment Cytosol dargestellt. Dabei wurden nur Messungen einbezogen, zu denen der Strahlstrom exakt bestimmt wurde.

Deutlich sichtbar sind starke Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen selbst am gleichen Messtag. Geht man davon aus, dass Schwankungen in der Dichte vernachlässigbar sind und sich der Wassergehalt des Cytosols zwischen den einzelnen Zellen kaum unterscheidet (also gleicher prozentualer Dickenverlust beim Gefrierdrying), sind die Schwankungen nur auf Variationen der Schnittdicke beim Kryoschneiden zurückzuführen.

In Tabelle 4-3 sind Angaben für durchschnittliche Massendicken unterschiedlicher Präparate enthalten. Unterschiedliche Massendicken wirken sich bei gleichen Messzeiten und Strömen vor allem auf die Größe des Kontinuums aus.



**Abb. 4-10** Massendicken von Messungen im Cytosol von Ventrikelmyozyten der Ratte in Abhängigkeit vom Datum der Messung

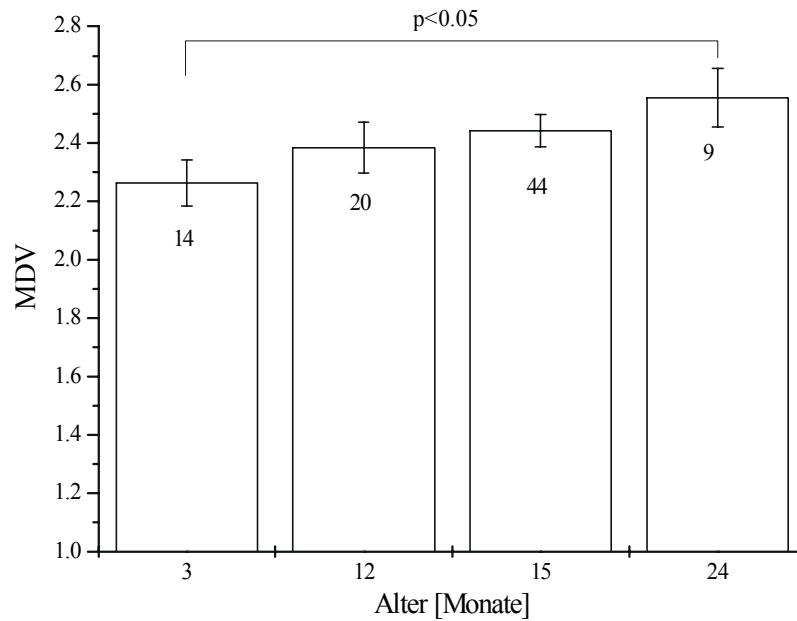
Da wir erst seit August 2000 über den Probenhalter mit Faradaykäfig zur Bestimmung des Strahlstroms verfügen, kann man zur Untersuchung funktioneller Abhängigkeiten das Verhältnis der Massendicken zweier Kompartimente des gleichen Schnittes untersuchen. Wird das Verhältnis MDV der Massendicken von Mitochondrien (Mit) und Cytosol (Cyt) aus Messungen am gleichen Schnitt unter gleichen Bedingungen gebildet (Gleichung 4-11), ist dieses vom Strahlstrom unabhängig:

$$(4-11) \quad \text{MDV} = \frac{(\rho D)_{\text{Mit}}}{(\rho D)_{\text{Cyt}}} = \frac{W_{\text{Mit}}}{t_{\text{Mit}} G_{\text{Mit}}} \frac{t_{\text{Cyt}} G_{\text{Cyt}}}{W_{\text{Cyt}}}$$

So können alle von uns durchgeführten Messungen miteinander verglichen werden.

In Abbildung 4-11 sind die Massendickenverhältnisse für Messungen an Ratten unterschiedlichen Alters dargestellt.

Die Messungen stimmen sehr gut mit den Ergebnissen aus (von Zglinicki, 1988) überein. Dieser führt den Anstieg mit dem Alter auf einen hauptsächlich Wasserungsverlust in den Mitochondrien zurück. Dies bedeutet, dass beim Vergleich von Konzentrationen aus gefriergetrockneten Präparaten unbedingt das Alter des Tieres berücksichtigt werden muss, wenn der Wassergehalt vor der Gefriertrocknung nicht bestimmbar ist. Ist der Wassergehalt messbar, können die Konzentrationen auf die hydratisierten Proben zurückgerechnet und diese verglichen werden.



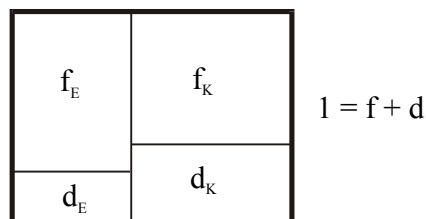
**Abb. 4-11** Abhängigkeit des Massendickenverhältnisses von Mitochondrien und Cytosol vom Lebensalter für Messungen an Ventrikelmyozyten von Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrem Fehler (SEM). Zwischen dem Wert bei einem Alter von 3 Monaten und dem Wert bei einem Alter von 24 Monaten ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von kleiner 0.05.

#### 4.10 Wassergehalt

Aus der Literatur sind die verschiedensten Methoden zur Bestimmung des Wassergehaltes mittels elektronenmikroskopischer Messungen bekannt (Chandler, 1976; Sun *et al.*, 1995; von Zglinicki *et al.*, 1987; von Zglinicki, 1991; Zierold, 1986). Diese lassen sich mit Messungen nach anderen Methoden, wie zum Beispiel dem Auswiegen und Austrocknen des Ventrikels vergleichen (Polimeni, 1974).

Mit elektronenmikroskopischen Messungen ist unter anderem eine einfache Abschätzung des Wassergehaltes über die aus Gleichung 4-10 berechnete Massendicke möglich. Man geht dabei davon aus, dass der die Schnitte der Ventrikelmyozyten umgebende Extrazellularraum aus der Lösung aus Kapitel 2.1 besteht, deren Wassergehalt 85.7 % betrug.

Man kann nun die Massendicke des interessierenden Kompartiments ( $\rho D$ )<sub>K</sub> mit der des Extrazellularraumes ( $\rho D$ )<sub>E</sub> ins Verhältnis setzen und berücksichtigen, dass gilt: Trockenanteil  $d_E$  und bekannter Wassergehalt  $f_E$  ergeben 1 (siehe Abbildung 4-12)



**Abb. 4-12** Zusammenhang zwischen Trockenanteil  $d$  und Wasseranteil  $f$  für ein Kompartiment der Zelle (Index K) und den Extrazellularraum (Index E)

Somit erhält man aus:

$$(4-12) \quad \frac{(\rho D)_K}{(\rho D)_E} = \frac{d_K}{d_E} = \frac{1 - f_K}{1 - f_E}$$

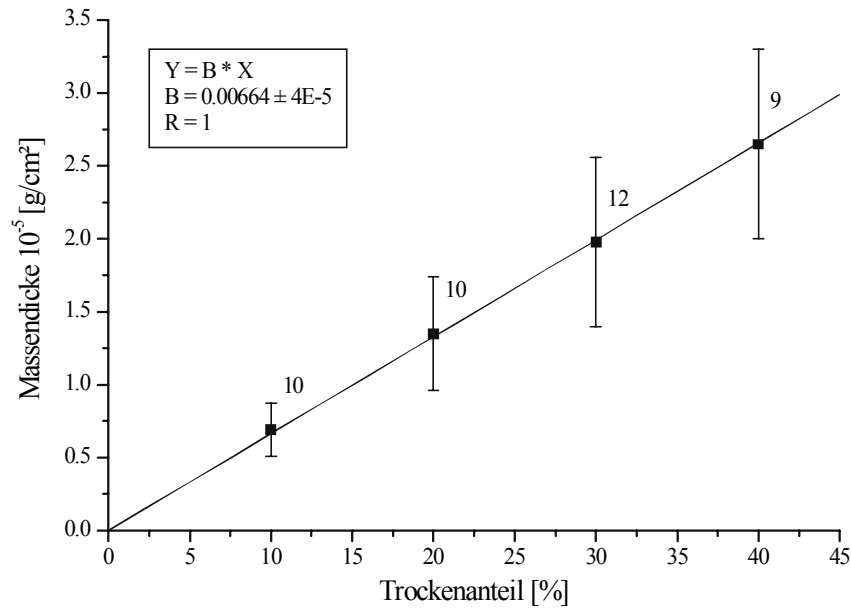
den Wassergehalt  $f_K$  nach:

$$(4-13) \quad f_K = 1 - \frac{(\rho D)_K}{(\rho D)_E} (1 - f_E)$$

Hierbei muss allerdings gewährleistet sein, dass es zu keinerlei Entmischung der Lösung im Extrazellularraum gekommen ist. Kommt es zu einer Entmischung und Sedimentation des Albumins, wird der Albuminanteil geringer und damit der Wasseranteil größer. Weiterhin wird vorausgesetzt, dass die Dichten von Extrazellularraum und Kompartiment vergleichbar sind. Zusätzlich muss angenommen werden, dass die Messungen in einem Bereich des Schnittes liegen, in dem die Schnittdicke beim Kryoschneiden zwischen Kompartiment und Extrazellularraum nicht variiert. Dieser Weg wurde bei der Bestimmung des Wassergehaltes in unseren Proben nicht verwendet, da Konzentrationsmessungen von Natrium und Chlor in den gefriergetrockneten Bereichen der Lösung sehr starke Schwankungen aufwiesen. Dies spricht für eine Entmischung und Sedimentation des Albumins und damit ist der für die Berechnung des Wassergehaltes nach Gleichung 4-13 benötigte Vergleichswert  $(\rho D)_E$  nicht mehr gesichert.

Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung des Wassergehaltes aus einer Eichkurve (Zierold, 1986). Zur Bestimmung des Wassergehaltes ist es notwendig, die Massendicke in den gefriergetrockneten Schnitten geeignet umzurechnen. Dazu wurde eine Kalibrierungsmessung mit Albuminstandards mit vorgegebenem Trockenanteil durchgeführt. Hierbei wurden exakt die Präparationsbedingungen wie bei den Einzelzellen eingehalten. Abbildung 4-13 zeigt die aufgenommene Kalibrierungskurve. Die verhältnismäßig große Standardabweichung wird durch die Variation der Schnittdicken bestimmt. Dabei ist diese absolut gesehen um so größer, je mehr Trockenanteil im Schnitt ist. Bezieht man sich auf die relativen Schwankungen und damit auf die Schwankungen der Schnittdicke im hydratisierten Zustand, ergeben sich zwischen den verschiedenen Trockenanteilen kaum noch Schwankungen. Die relative Größe der Standardabweichung beträgt zwischen 24.5 und 29.3 %.

Aus der Kurve ergibt sich mittels linearer Regression der Proportionalitätsfaktor zwischen Massendicke und Trockenanteil. Mit diesem können aus den gemessenen Massendicken der einzelnen Kompartimente der Herzmuskelzellen der Trockenanteil und damit der Wassergehalt im hydratisierten Zustand bestimmt werden.



**Abb. 4-13** Zusammenhang zwischen Massendicke und Trockenanteil für Albuminstandards. Die Fehlerbalken stellen jeweils die Standardabweichung dar. Die lineare Regression liefert einen Anstieg von  $B=0.00664$  bei einem Regressionskoeffizienten von  $R=1$ . Die Zahlen neben den Messpunkten stellen die Anzahl der Messungen pro Punkt dar.

Dazu müssen also die berechneten mittleren Massendicken durch  $0.00664$  dividiert werden. Es ergeben sich für Messungen an der Ratte und am Menschen Wassergehalte nach Tabelle 4-4.

Probe	Massendicke $10^{-5}$ [g/cm $^2$ ]	N	Wassergehalt Berechnet [%]	Wassergehalt Literatur [%]	N
Ratte (Mito.)	$3.69 \pm 0.09$	180	$44.4 \pm 1.2$	$45.4 \pm 0.6$	120
Ratte (Cytosol)	$1.51 \pm 0.05$	175	$77.3 \pm 2.7$	$75.6 \pm 4.0$	16
Ratte (Kern)	$0.96 \pm 0.09$	6	$85.5 \pm 8.5$	--	--
Mensch (Mito.)	$3.64 \pm 0.22$	23	$45.2 \pm 3.0$	--	--
Mensch (Cytosol)	$1.48 \pm 0.14$	24	$77.7 \pm 7.8$	--	--

**Tab. 4-4** Aus mittlerer Massendicke berechneter Wassergehalt (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) für Herzmuskelzellen von Mensch und Ratte. N ist die Anzahl der berücksichtigten Messungen. Literaturwerte für Mitochondrien der Ratte aus (von Zglinicki, 1988) und Werte für Cytosol (A-Bande) aus (von Zglinicki *et al.*, 1987)

## 5 Fehlermöglichkeiten bei der quantitativen Auswertung der Spektren

### 5.1 Verteilung der Röntgenquanten

Die Emission von Röntgenquanten pro Zeiteinheit und Raumwinkel folgt einer Poissonverteilung, wenn der Quantenstrahler über die Messzeit konstant bleibt (Gnedenko, 1968).

Das ist bei uns der Fall, wenn man annimmt, dass der Strahlstrom konstant bleibt und kein Masseverlust in der Probe und keine zusätzliche Kontamination während der Messzeit auftreten.

Das bedeutet für die Elektronenstrahlmikroanalyse, dass ebenfalls die dispersiv und nicht-dispersiv registrierten Impulsraten eines Quantenzählers (Detektorsystem) unter der Voraussetzung konstanter Gerätebedingungen poissonverteilt sind (Cobet & Uhlmann, 1973).

Das heißt, es wird angenommen, der im Kanal  $i$  gemessene Wert  $S_i$  entspricht dem Erwartungswert der poissonverteilten Zufallsgröße  $S_i$ . Der stochastische Fehler der Bestimmung von  $S_i$  in Form der Varianz  $\sigma_i^2$  ist somit ebenfalls  $S_i$ .

### 5.2 Einfluss stochastischer Schwankungen

Zur Trennung der die Verteilung der Messergebnisse beeinflussenden Größen, wie biologische Variabilität der Präparate, Streuung des Messsystems, stochastische Schwankungen der Messgröße und Einfluss der mathematischen Analyse zur Berechnung der Elementkonzentrationen, sind Simulationsrechnungen gut geeignet (Lifshin *et al.*, 1998).

Es werden mittels eines selbst geschriebenen Simulationsprogramms EDS-Spektren mit vorgegebener Variabilität erzeugt.

Bei diesen Spektren wird der in der Realität nicht gegebene Fall der streuungsfreien Probe und des konstanten Meßsystems bzw. eine vorgegebene Variabilität des Meßsystems erreicht. Dadurch ist es möglich, die Einflüsse der Spektrenanalyse, das heißt die Streuungsanteile bei der Berechnung der Konzentration der einzelnen Elemente aus dem EDS-Spektren, im Einzelnen zu bestimmen.

Alle folgenden Berechnungen beziehen sich im Wesentlichen wieder auf das biologisch und für unsere Forschungen besonders wichtige Element Calcium.

Bei der Erstellung der simulierten Spektren wird der Verlauf des Kontinuums nach der Kramers-Gleichung (Gleichung 3-5) simuliert. Dabei lässt sich die Höhe des Kontinuums an der Energie von Ca-K $\alpha$  vorgeben und daraus der Verlauf des Kontinuums für die von uns verwendeten biologischen Präparate berechnen. Die dazu verwendete Näherungsformel:

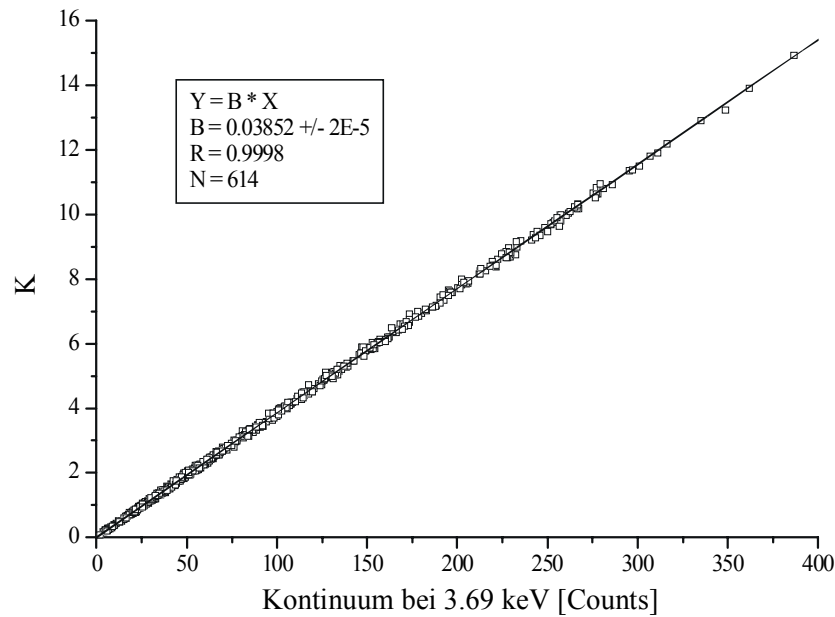
$$(5-1) \quad S(E) = \frac{100-E}{E} 0.03852 S(3.69 \text{ keV})$$

wurde aus dem Fit der Kramers Gleichung an 614 Spektren mit unterschiedlicher Höhe des Kontinuums nach der Gleichung:

$$(5-2) \quad S(E) = K \frac{100-E}{E}$$



und anschließender Anpassung des Faktors K an die Höhe des Kontinuums bei der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  (siehe Abbildung 5-1) gewonnen.



**Abb. 5-1** Korrelation zwischen der Höhe des Kontinuums bei der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  und dem Faktor K aus Gleichung 5-2; die lineare Regression aus  $N=614$  Werten ergibt einen Anstieg der Geraden von  $B=0.03852$  bei einem Regressionskoeffizienten von  $R=0.9998$

Weiterhin werden die charakteristischen Peaks für das jeweilige Element vorgegeben. Die Lage der Peaks (also die Energie des Peakmaximums,  $E_{K\alpha}$  und  $E_{K\beta}$ ), die FWHM der Peaks ( $\sigma_{K\alpha}$  und  $\sigma_{K\beta}$ ) und das Verhältnis  $v$  zwischen den Amplituden von  $K\alpha$ - und  $K\beta$ -Peak lassen sich variieren. Ein simulierter Peak ohne Rauschen ergibt sich also aus:

$$(5-3) \quad S(E) = \frac{Pa}{1+v} \left( \frac{v}{\sqrt{2\pi}\sigma_{K\alpha}} \exp\left(-\frac{(E-E_{K\alpha})^2}{2\sigma_{K\alpha}^2}\right) + \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{K\beta}} \exp\left(-\frac{(E-E_{K\beta})^2}{2\sigma_{K\beta}^2}\right) \right)$$

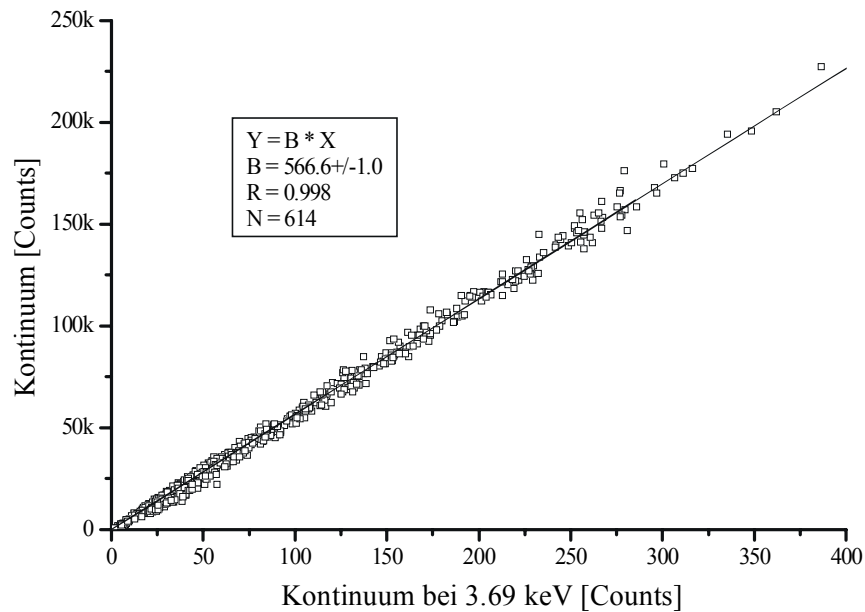
wobei Pa die Summe aller charakteristischen Röntgenquanten der Kalium-K-Peaks ist. Über die Hall-Gleichung 3-11 wird für eine vorgegebene Konzentration und gegebenen Mittelwert von  $Z^2/A$  das Peakintegral Pa berechnet:

$$(5-4) \quad Pa = \frac{c_i W \text{Stfak}}{Z^2 / A}$$

Das Kontinuumintegral W (ermittelt zwischen 1 keV und 5 keV) ergibt sich aus der Höhe des Kontinuums im Kanal der Energie der Calcium- $K\alpha$ -Linie ( $\text{Ca}_{K\alpha}$ ) nach:

$$(5-5) \quad W = 566.6 S(3.69\text{keV})$$

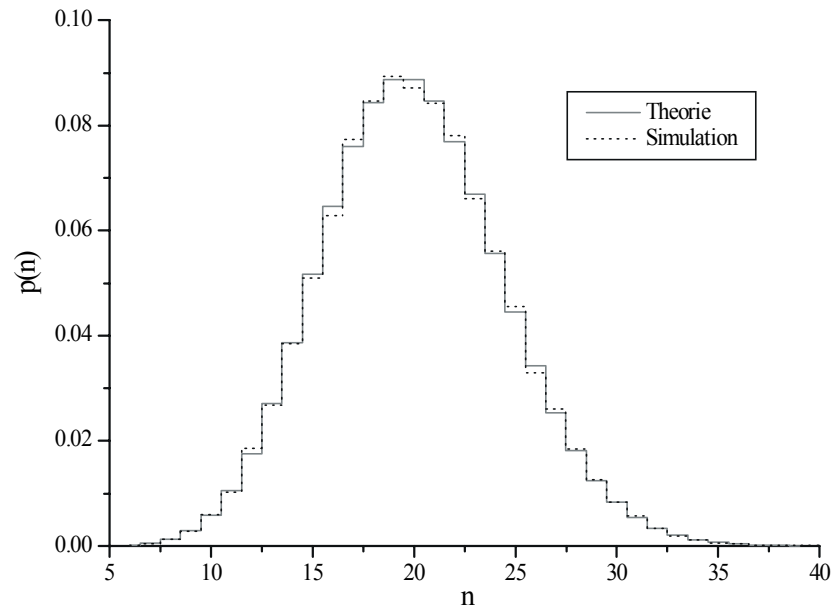
Diese Gleichung folgt aus dem Fit an die Messwerte aus Abbildung 5-2.



**Abb. 5-2** Korrelation zwischen dem aus MLSQ-Fit ermittelten Kontinuumintegral zwischen 1 keV und 5 keV und der Höhe des Kontinuums bei der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha_1}$ ; die lineare Regression an  $N=614$  Werte ergibt einen Anstieg der Geraden von  $B=566.6$  bei einem Regressionskoeffizienten von  $R=0.998$

Um aber Aussagen über Streuungen und somit über Auswirkungen auf die Verteilung der Konzentration zu treffen, müssen stochastisch verteilte Spektren verwendet werden. Dazu wird das „glatte“ Spektrum mit einer Poissonverteilung gefaltet. Das bedeutet, es wird zur jeweiligen Energie eines Kanals der „glatte“ Wert als Erwartungswert der Poissonverteilung verwendet und zufällig ein Wert aus dieser Verteilung für das statistisch verteilte „verrauschte“ Spektrum gewählt (gewichtet nach der Wahrscheinlichkeit  $p(n)$ ).

In Abbildung 5-3 wurde die Qualität dieser erzeugten stochastisch verteilten Spektren getestet, indem die aus 50000 simulierten Spektren gemittelte Verteilung mit der theoretischen Poissonverteilung (Erwartungswert  $\lambda=20$ ) verglichen wurde.



**Abb. 5-3** Vergleich zwischen theoretischer Poissonverteilung  $p(n)$  mit dem Erwartungswert  $\lambda=20$  und mittels stochastischer Simulation erzeugten Verteilungen

Mit den nach obigen Vorgehen erzeugten stochastisch verteilten Spektren lassen sich jetzt die Einflüsse einzelner bei der mathematischen Analyse der Spektren variierbarer Parameter untersuchen.

### 5.2.1 Abhängigkeit der Analyse vom Top-Hat-Filter

Im ersten Schritt wurde untersucht, wie sich die Variation des THF-Filters auf die Analyse zur Bestimmung der Calciumkonzentration auswirkt. Dabei wurde sowohl die Breite des inneren (positiv gewichteten) Anteils des Filters  $2m+1$ , als auch die Breite des äußeren (negativ gewichteten) Anteils des Filters  $2n$  aus Gleichung 3-6 variiert. Angegeben sind im Folgenden immer die Werte  $m$  als THF-innen und  $n$  als THF-außen.

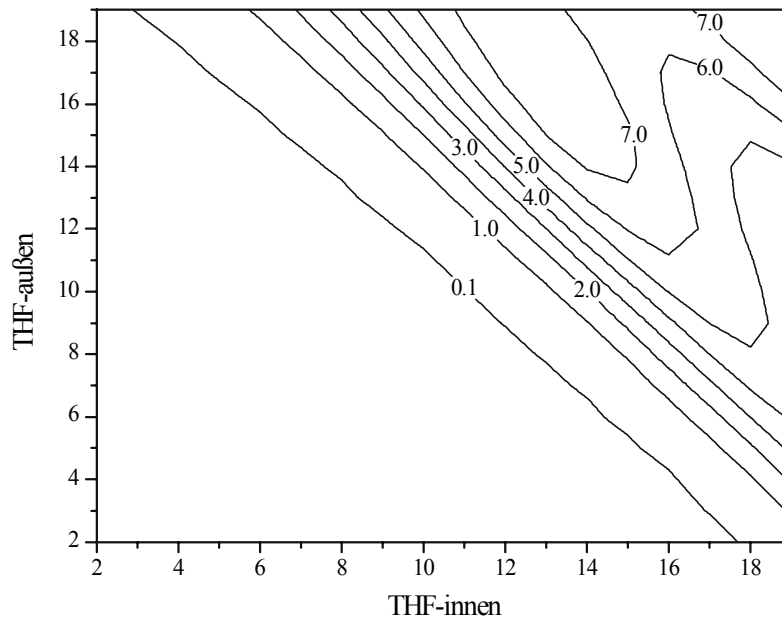
Statham (Statham, 1977) bestimmte die Größe des Top-Hat-Filters aus einer Analyse des Fehlers des Koeffizientenvektors  $\underline{c}$  des MLSQ-Fits nach Kapitel 3.3.

Er kommt auf einen Filter von  $m=3$  und  $n=4$ , wobei die Kanalbreite bei ihm 20 eV betrug.

Mit der Möglichkeit der simulierten Spektren verwenden wir mehrere verschiedene Parameter zur Einschätzung der Güte des verwendeten Filters. Dabei wird nicht nur die Variation der bestimmten Konzentration, also die Breite der Verteilung für stochastisch verteilte Spektren, wie bei Statham, untersucht, sondern auch die Abweichungen zwischen vorgegebener und mittels Analyse ermittelter Konzentration. Dies berücksichtigt die glättende (mittelnde) und damit das Rauschen reduzierende Wirkung des Top-Hat-Filters, die für sehr große Filter zu einer Reduzierung der Streuung führt, aber den eigentlichen Messwert, die Elementkonzentration, stark verfälscht.

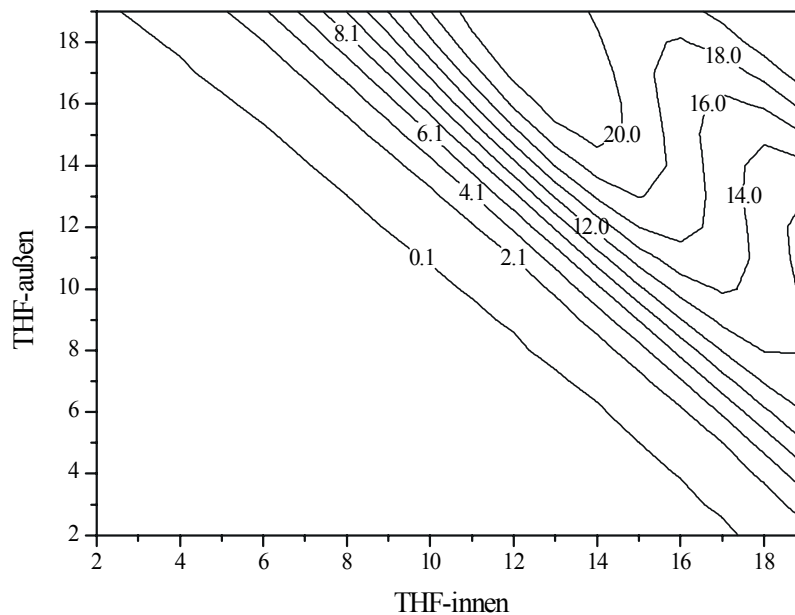
In Abbildung 5-4 sind die Ergebnisse für die Berechnung der Calciumkonzentration aus nicht verrauschten, glatten Spektren mit einer vorgegebenen Kaliumkonzentration von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  und einem Kontinuum von 200 Counts an der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  darge-

stellt. Diese Kaliumkonzentration und das angegebene Kontinuum entsprechen in etwa den Bedingungen für die von uns durchgeführten Messungen an Mitochondrien in Herzmuskelzellen.



**Abb. 5-4** Abhängigkeit der Calciumkonzentration vom zur Analyse verwendeten Top-Hat-Filter bei glatten Spektren, einem Kontinuum von 200 Counts bei der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  und einer Kaliumkonzentration von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ; die vorgegebene Calciumkonzentration war  $0 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ .

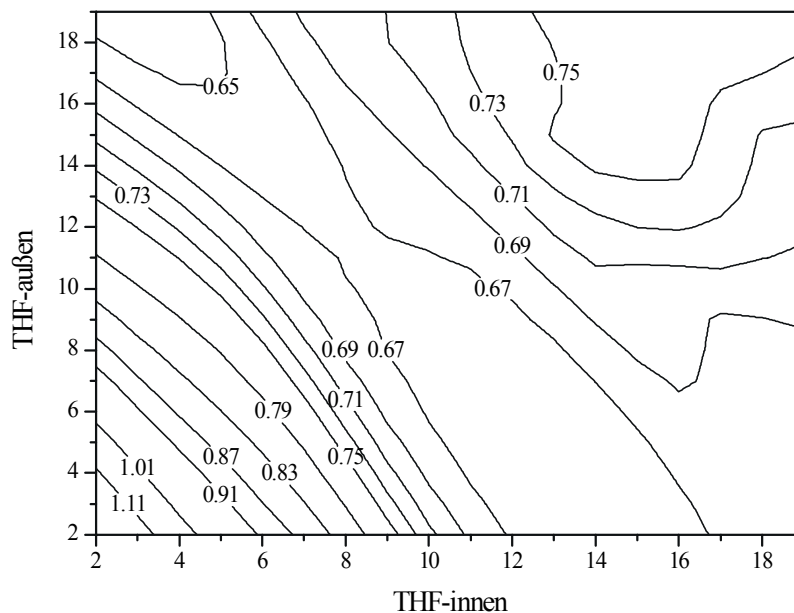
Betrachtet man die Verhältnisse bei der Analyse des anderen uns interessierenden Zellkompartiments, des Cytosols, zeigen sich vergleichbare Abhängigkeiten, allerdings mit stärkerer Ausprägung (Abbildung 5-5).



**Abb. 5-5** Abhängigkeit der Calciumkonzentration in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$  vom zur Analyse verwendeten Top-Hat-Filter bei glatten Spektren, einem Kontinuum von 100 Counts bei der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  und einer Kaliumkonzentration von  $700 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ .

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bis zu einer Gesamtfilterbreite von etwa  $2 \cdot (17+2)+1$  Kanälen, also etwa 390 eV bei einer Kanalbreite von 10 eV, die Analyse glatter Spektren mittels Top-Hat-Filter keine Calciumkonzentration in Spektren induziert, in denen kein Ca enthalten ist. Bei größeren Filtern wird das Vorhandensein von Ca in der Anwesenheit von Kalium vorgetäuscht. Hier ist die Größe der fälschlicherweise ermittelten Calciumkonzentration von der im Spektrum enthaltenen Kaliumkonzentration abhängig.

Betrachtet man nun keine glatten, sondern mit oben beschriebener Simulationsrechnung veräuschte Spektren, kann die Standardabweichung der ermittelten Calciumkonzentration als weiteres Maß zur Beurteilung der Qualität des Filters berücksichtigt werden (Abbildung 5-6). Da in biologischen Proben und vor allem in den von uns untersuchten Herzmuskelzellen stets die Kombination von hoher Kalium- und sehr kleiner Calciumkonzentration vorkommt, kann als weiterer Parameter zur Beurteilung des Top-Hat-Filters noch die Standardabweichung der mit Hilfe des gefilterten MLSQ-Fit ermittelten Kaliumkonzentration hinzugezogen werden (Abbildung 5-7).

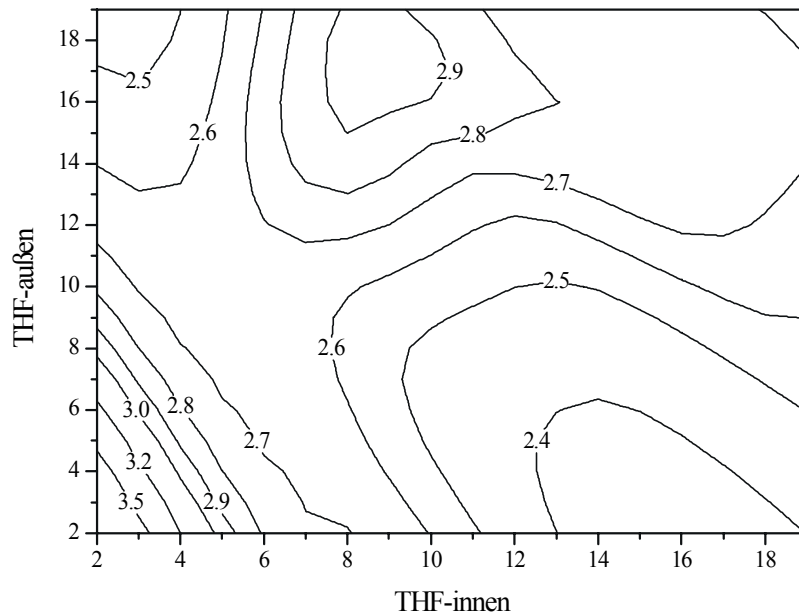


**Abb. 5-6** Abhängigkeit der Standardabweichung der Calciumkonzentration in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$  vom zur Analyse verwendeten Top-Hat-Filter bei stochastisch verrauschten Spektren, einem Kontinuum von 200 Counts bei der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  und einer Kaliumkonzentration von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$

Unter Berücksichtigung der aus Abbildung 5-4 gewonnenen Information über die Filterbereiche, die zur exakten Berechnung der Konzentration von Calcium führen, können aus den Abbildungen 5-6 und 5-7 diejenigen Filterbereiche ermittelt werden, die zu einer möglichst kleinen Streuung der berechneten Konzentrationen führen. Mit einer Minimierung der Streuung der berechneten Konzentrationen ist eine Erhöhung der Signifikanz bei gleicher Anzahl der Messungen und somit eine bessere Unterscheidung von funktionellen Zuständen möglich.

Die minimale Standardabweichung für Kalium und Calcium in den Filterbereichen der exakt ermittelten Konzentration für Calcium ergibt sich für einen Top-Hat-Filter mit folgenden Ausmaßen:  $m$  (THF innen) im Bereich 12 bis 16 Kanälen und dazugehörigen  $n$  im Bereich von 6 bis 2 Kanälen. Somit ergibt sich für eine Kanalbreite von 10 eV eine Breite des inneren

Bereichs von 250 eV bis 330 eV bei einer Gesamtbreite des äußeren Bereiches von 120 eV bis 40 eV.



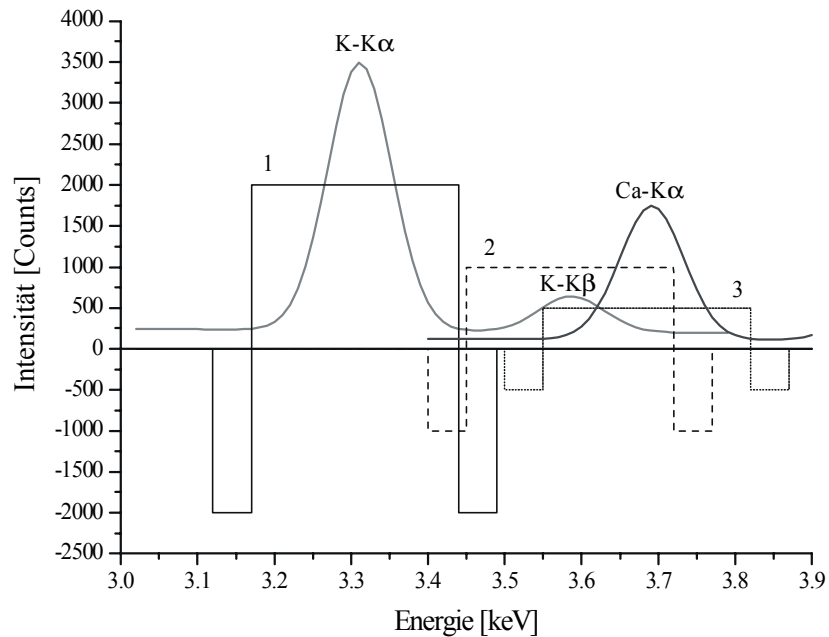
**Abb. 5-7** Abhängigkeit der Standardabweichung der K-Konzentration in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$  vom zur Analyse verwendeten Top-Hat-Filter bei stochastisch verrauschten Spektren, einem Kontinuum von 200 Counts bei der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  und einer Kaliumkonzentration von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$

Betrachtet man in Abbildung 5-8 die Ausdehnung und den Verlauf des Kalium- $\text{K}\alpha$ - und Kalium- $\text{K}\beta$ -Peaks und die Position des Calcium- $\text{K}\alpha$ -Peaks, ergeben sich sofort Zusammenhänge zwischen den oben erwähnten optimalen Filterbereichen und den Distanzen zwischen den einzelnen Energien und den Breiten der Peaks.

Der in Abbildung 5-8 eingezeichnete Top-Hat-Filter mit der Dimension  $m=13$  und  $n=5$  entspricht in seiner inneren Breite von 270 eV in etwa dem  $3\sigma$ -Bereich des Kalium- $\text{K}\alpha$ -Peaks von 252 eV und in seinem einseitigen äußeren Bereich von 50 eV in etwa dem Abstand zwischen den  $3\sigma$ -Bereichen von Kalium- $\text{K}\alpha$ -Peak und Kalium- $\text{K}\beta$ -Peak von etwa 30 eV.

Weiterhin ist zu sehen, dass sich die THF-Bereiche des dominierenden Kalium- $\text{K}\alpha$ -Peaks und des Calcium- $\text{K}\alpha$ -Peaks in ihrer zentralen Lage nicht überlappen.

Dies wiederum lässt den Schluss zu, dass es je nach dem Überlappungsgrad zweier Peaks, dem Abstand zwischen den Peaks und der FWHM der Peaks unterschiedliche optimale Top-Hat-Filter gibt. Somit kann es bei der Anwendung eines festen Filters auf das gesamte Spektrum nicht für alle Elemente die optimale Filtereinstellung und damit auch nicht die kleinste durch den THF-Filter erzeugte Streuung geben.



**Abb. 5-8** Spektrum mit Kaliumpeak bei einer Kaliumkonzentration von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ , Top-Hat-Filter mit  $m=13$  und  $n=5$  bei verschiedenen Mittenenergien, 1 (durchgezogene Linie) für Kalium-K $\alpha$ -Peak, 2 (gestrichelte Linie) für Kalium-K $\beta$ -Peak und 3 (gepunktete Linie) für Calcium-K $\alpha$ -Peak

Bei weiteren Betrachtungen von Parametern, welche die Analyse der Spektren hinsichtlich ihres Calciumgehaltes beeinflussen, wurde mit einem Top-Hat-Filter der Dimension  $m=13$  und  $n=5$  gerechnet.

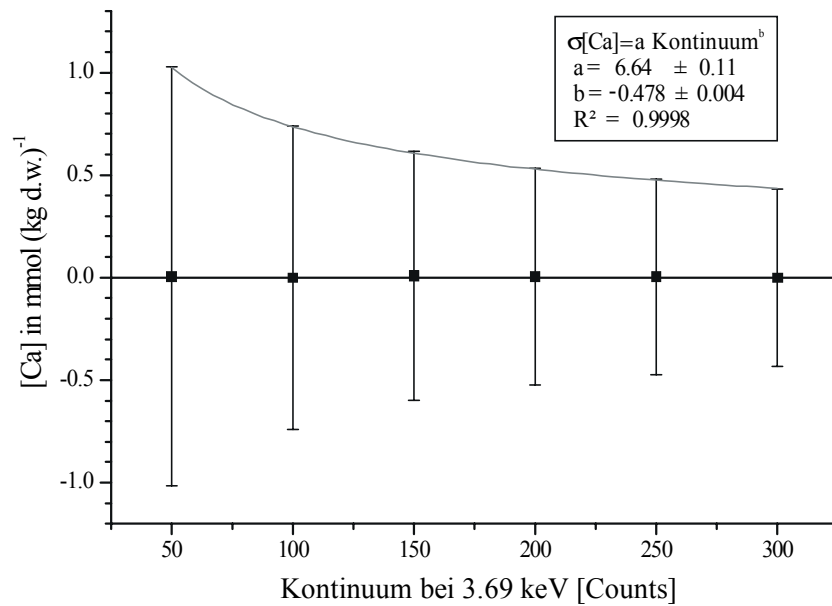
### 5.2.2 Abhängigkeit der Calciumverteilung von der Höhe des Kontinuums

Es wurde mit dem in Kapitel 5.2.1 bestimmten optimalen Top-Hat-Filter versucht, an simulierten stochastisch verteilten Spektren die Abhängigkeit der Verteilung der berechneten Calciumkonzentration von der Größe des Kontinuums zu untersuchen.

Bei der Messung von Spektren am Elektronenmikroskop spielt es dabei keine Rolle, ob das höhere Kontinuum durch eine längere Messzeit oder einen höheren Probenstrom entsteht, solange man Masseverlust und andere Effekte (z.B. Zählrateneffekte) vernachlässigen kann.

Bei der Simulation wurden Spektren erzeugt, die kein Kalium und ebenfalls kein Calcium enthielten. Es wurden für verschiedene Größen der Intensität bei der Energie von Calcium K $\alpha$  im Spektrum aus den berechneten Calciumkonzentrationen für 10000 Spektren Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

Den Zusammenhang zwischen diesen Größen und der Höhe des Kontinuums zeigt dabei Abbildung 5-9.



**Abb. 5-9** Zusammenhang zwischen Standardabweichung der mittels MLSQ-Fit bestimmten Calciumkonzentration und Größe des Kontinuums an der Energie von Ca-K $\alpha$ , ohne Kaliumpeak; die Regression an eine Potenzfunktion ergab als Potenz  $b=-0.478$  bei einem Regressionskoeffizienten von  $R^2=0.9998$ .

Die Mittelwerte der Calciumkonzentrationen zeigen dabei nur geringe Abweichungen von Null, die maximale beträgt  $0.008 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bei einem Kontinuum an der Energie von Ca $\text{K}\alpha$  von 150 Counts.

Wie sich aus dem Fit an die Standardabweichungen zeigt, gibt es einen Zusammenhang zwischen der Standardabweichung und dem Kontinuum mit einer Potenz von etwa -0.5. Dies entspricht dem Verhältnis zwischen Streuung der Messwerte und Größe der Messwerte bei Betrachtung einer reinen Poissonverteilung:

$$(5-6) \quad \sigma\{X = \text{Poisson}\} / E\{X = \text{Poisson}\} = \sqrt{\lambda} / \lambda = \lambda^{-0.5}$$

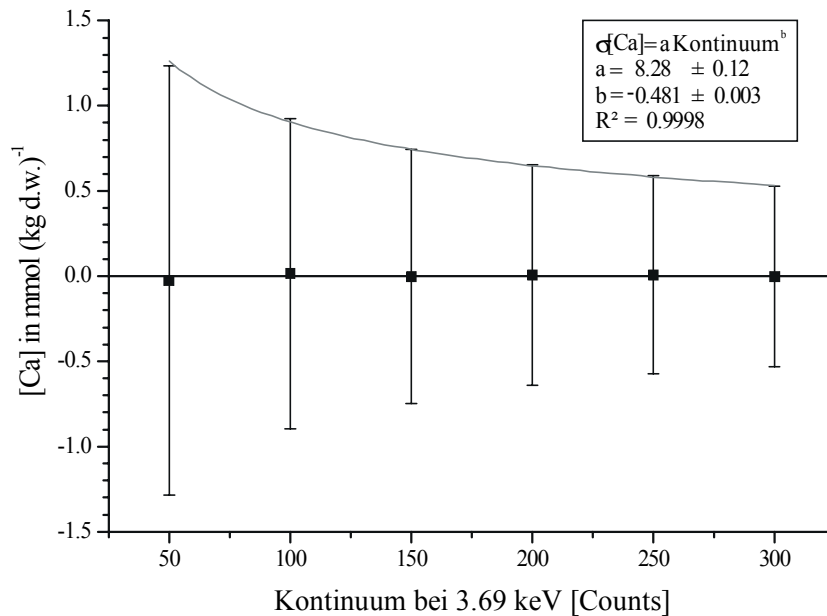
Diese Standardabweichung ist also die kleinstmögliche Breite einer Verteilung von gemessenen sehr kleinen identischen Calciumkonzentrationen, wenn man keine messbare Kaliumkonzentration in der Probe hat und keine systematischen Fehler auftreten. Bei Signifikanztests sind aus diesen Standardabweichungen und einer vorgegebenen Anzahl von Messungen die kleinstmöglichen signifikanten Differenzen ermittelbar. Bei 2 Messreihen mit jeweils 100 Messungen müssten die Mittelwerte der Calciumkonzentrationen bei einem Kontinuum von 200 Counts an der Energie von Ca $\text{K}\alpha$  (dann ist  $\sigma=0.53 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ) also mindestens  $0.1 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  auseinanderliegen (für ein Signifikanzniveau von 0.05, siehe Kapitel 3.7).



### 5.2.3 Abhängigkeit der Calciumverteilung von der Kaliumkonzentration

Interessant wird nur der Übergang von den simulierten Spektren ohne Kalium zu den unseren Messungen entsprechenden Spektren mit vorgegebenen Kaliumgehalt.

Es wurden dabei die gleichen Untersuchungen wie in Kapitel 5.2.2 für eine Kaliumkonzentration von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 5-10.

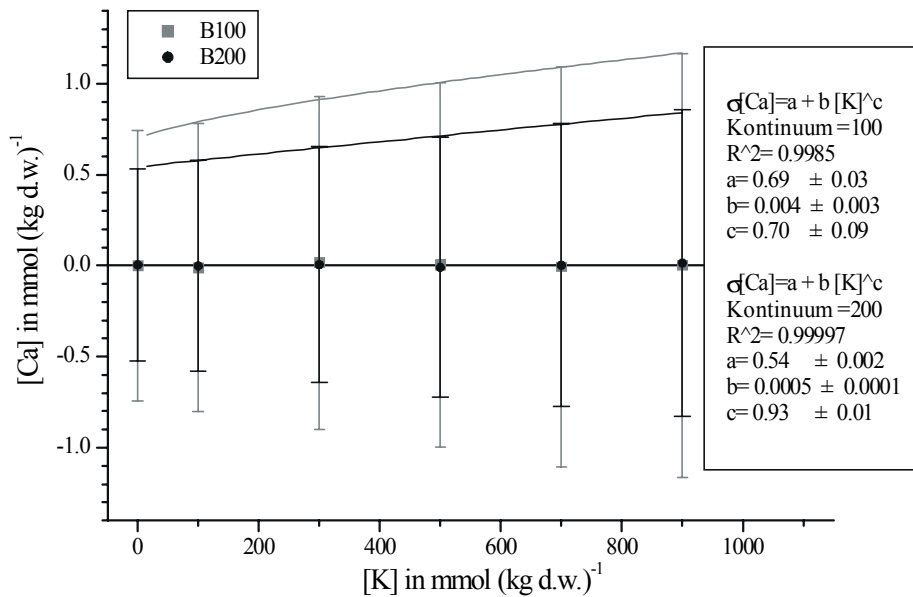


**Abb. 5-10** Zusammenhang zwischen Standardabweichung der mittels MLSQ-Fit bestimmten Calciumkonzentration und Größe des Kontinuums an der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  bei einer Kaliumkonzentration von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ; die Regression an eine Potenzfunktion ergab als Potenz  $b=-0.481$  bei einem Regressionskoeffizienten von  $R^2=0.9998$ .

Auch hier zeigen die Mittelwerte der Calciumkonzentrationen nur geringe Abweichungen von Null, die maximale beträgt  $-0.024 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  bei einer Höhe des Kontinuums an der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  von 50 Counts.

Wie sich aus dem Fit an die Standardabweichungen zeigt, ergibt sich der gleiche Zusammenhang zwischen der Standardabweichung und dem Kontinuum mit einer Potenz von etwa  $-0.5$ . Der Unterschied in der Größe der Standardabweichung und damit in der Breite der Verteilung der berechneten Calciumkonzentrationen ist somit nur durch das Verhältnis der Faktoren  $a$  des Fits bestimmt. Es ergibt sich also in Anwesenheit von  $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  Kalium eine um  $8.0/6.4=1.25$ -fach erhöhte Standardabweichung. Damit ist nach Kapitel 3.7 Gleichung 3-35 auch eine um das 1.25-fache größere Differenz zweier Mittelwerte notwendig, um bei gleicher Messwertzahl auf einen signifikanten Unterschied zu kommen.

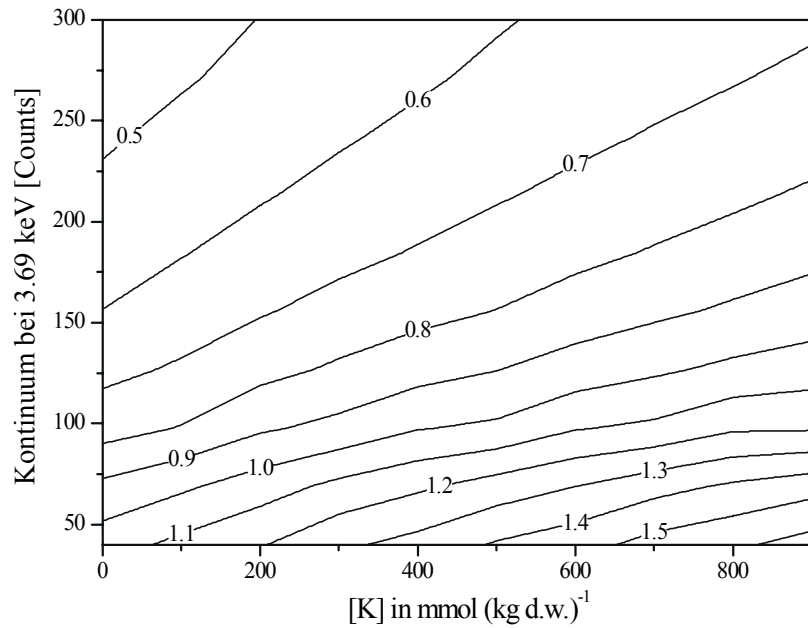
Weiterhin ist es nun interessant zu untersuchen, wie sich die Abhängigkeit der Streuung bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen und festem Kontinuum darstellt. Dazu wurden Simulationen bei einem Kontinuum von 100 und 200 Counts an der Energie von  $\text{Ca}_{K\alpha}$  für verschiedene Konzentrationen für Kalium durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-11 dargestellt.



**Abb. 5-11** Zusammenhang zwischen Mittelwert [Ca] und Standardabweichung  $\sigma[\text{Ca}]$  der Calciumkonzentration und in Probe enthaltener Kaliumkonzentration [K]; a, b, c sind die Koeffizienten bei der Regression einer Potenzfunktion an die Werte von  $\sigma[\text{Ca}]$  unter Berücksichtigung der Höhe des Kontinuums; R<sup>2</sup> gibt den jeweiligen Regressionskoeffizienten an.

Wie zu sehen ist, erhöht sich die Standardabweichung mit zunehmender Konzentration, wobei die Zunahme für kleinere Kontinua stärker ausfällt als für höhere Kontinua (längere Messzeiten bzw. höherer Strom). Die Mittelwerte der Calciumkonzentrationen sind wieder nicht wesentlich von Null verschieden.

In Abbildung 5-12 ist der allgemeine Zusammenhang zwischen stochastisch bedingter Breite der Verteilung der Calciumkonzentration für kleine Calciumkonzentrationen nahe Null in Abhängigkeit von der Höhe des Kontinuums und der in der Probe enthaltenen Kaliumkonzentration dargestellt. So ergibt sich für bei uns auftretende typische Konstellationen von 350 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> Kalium und einem Kontinuum von etwa 200-250 Counts (entspricht Mitochondrienmessungen) ein stochastisch bedingter Fehler von etwa 0.6 bis 0.7 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup>. Bei Messungen am Cytosol mit einer Höhe des Kontinuums im Bereich von 100 Counts und einer Kaliumkonzentration von etwa 700 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> liegt die berechnete Standardabweichung der Calciumkonzentration im Bereich 1.1 bis 1.2 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup>.



**Abb. 5-12** Abhängigkeit der Standardabweichung der Calciumkonzentration in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> von der Höhe des Kontinuums bei 3.69 keV und der im Messbereich enthaltenen Kaliumkonzentration bei einem Top-Hat-Filter von  $m=13$ ;  $n=5$

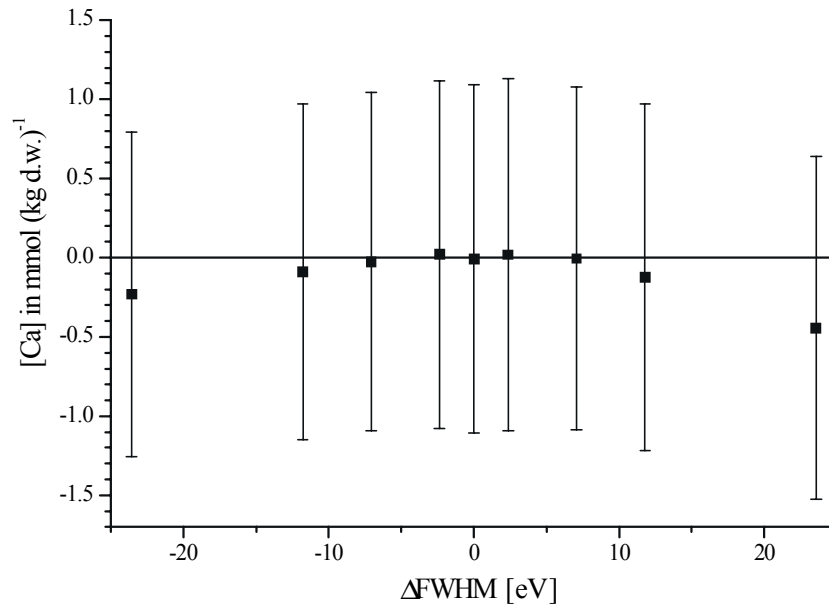
### 5.3 Einfluss der Kalibrierung

Wird die Kalibrierung des Spektrums wie in Kapitel 3.1 durchgeführt, kann es auf Grund von Abweichungen von der dort beschriebenen notwendigen Linearität, zur Notwendigkeit des Einbeziehens der zusätzlichen Korrektur nach Kapitel 3.3.2 kommen.

Um die Auswirkungen dieser Korrektur auf die berechnete Calciumkonzentration zu untersuchen, wurde an stochastisch simulierten Spektren die Position und Resolution des Kaliumpeaks im Vergleich zum verwendeten Kaliumprofil verändert. Die Simulationen wurden dabei wieder an 10000 stochastisch verteilten Spektren mit dem oben bestimmten Top-Hat-Filter durchgeführt.

#### 5.3.1 Abhängigkeit der Calciumverteilung von der FWHM des Kaliumpeaks

Zuerst wurde die Abhängigkeit der Calciumverteilung (mit einer vorgegeben Calciumkonzentration von 0 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup>) von Schwankungen in Breite des Kaliumpeaks untersucht. Dazu wurde die Breite des Kaliumpeaks im simulierten Spektrum im Vergleich zur Breite des Kaliumprofils um bis zu 20 eV vergrößert oder verkleinert (FWHM des Kaliumprofils betrug 99 eV).



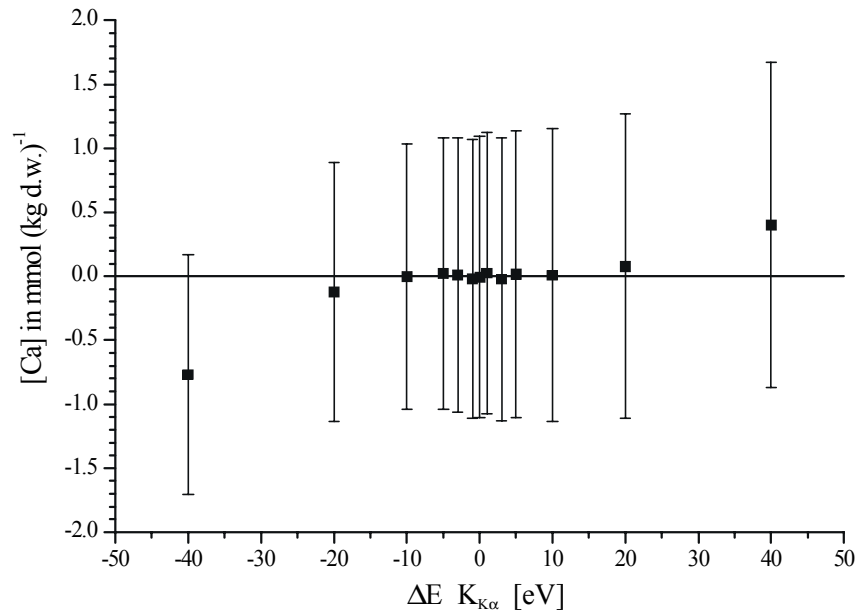
**Abb. 5-13** Zusammenhang zwischen Schwankungen in der Detektorauflösung ( $\Delta\text{FWHM}$ , Abweichungen zur FWHM des Kaliumprofils von 99 eV) und der mittleren Konzentration von Calcium [Ca]; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung für 10000 simulierte Spektren dar.

Die Standardabweichung der Calciumverteilung zeigt kaum Veränderungen in Abhängigkeit von der Differenz der Breiten der Kaliumpeaks von Profil und Spektrum.

Beträgt die Abweichung nach Kalibrierung allerdings mehr als 10 eV in beide Richtungen, kommt es zu einem deutlichen Unterschied der Calciumkonzentration von Null. Das bedeutet, dass in diesem Bereich die Korrektur über Einbeziehen der 1. und 2. Ableitung in den MLSQ-Fit nach Kapitel 3.3.2 nicht mehr ausreichend ist. Allerdings traten in unseren Messungen nach der Kalibrierung nie größere Abweichungen als etwa 2 eV in beide Richtungen auf.

### 5.3.2 Abhängigkeit der Calciumverteilung von der Position des Kaliumpeaks

Wie im vorherigen Kapitel wurde nun die Abhängigkeit der Calciumverteilung (mit einer vorgegeben Calciumkonzentration von 0 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup>) von Schwankungen in der Position des Kaliumpeaks untersucht. Dazu wurde die Position des Kaliumpeaks im simulierten Spektrum im Vergleich zur Position des Kaliumprofil auf der Energieskala um bis zu 40 eV vergrößert oder verkleinert (Position des Kalium-K $\alpha$ -Peaks 3.31 keV).



**Abb. 5-14** Zusammenhang zwischen Schwankungen in der Energieskala des Detektors (Position des Kaliumpeaks im simulierten Spektrum im Vergleich zur Position des Kaliumprofils,  $\Delta E K_{K\alpha}$ ) und der mittleren Konzentration von Calcium; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung für 10000 simulierte Spektren dar.

Die Standardabweichung der Calciumverteilung zeigt kaum Veränderungen im Bereich von  $\Delta E < 10$  und wird dann bei positiven Verschiebungen der Position des Kaliumpeaks auf der Energieskala etwas größer.

Die mittlere Konzentration von Calcium ist im Bereich  $\Delta E < 10$  nicht wesentlich vom vorgegebenen Wert ( $0 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ) verschieden. Das bedeutet, in diesem Bereich ist die Korrektur über Einbeziehen der 1. und 2. Ableitung in den MLSQ-Fit nach Kapitel 3.3.2 ausreichend. In unseren Messungen traten nach der Kalibrierung höchstens Abweichungen von kleiner 2 eV in beide Richtungen auf.

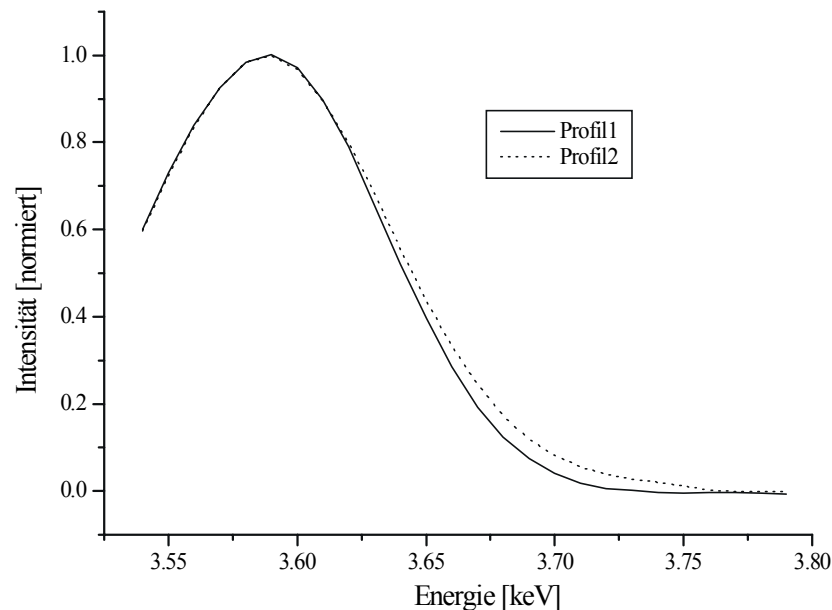
#### 5.4 Einfluss der Profile

Die Profile werden aus Messungen an reinen binären Kristallen bestimmt (siehe Kapitel 2.2), um auch die kleinsten Anteile anderer Elemente und damit Einflüsse auf deren Konzentration zu vermeiden. So wird das Kaliumprofil aus einem KCl oder  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Kristall bestimmt. Bei der Aufnahme der Profile ist nun darauf zu achten, einen möglichst dünnen Bereich auszuwählen, um Absorptionseffekte zu vermeiden.

In Abbildung 5-15 sind zwei Profile aus unterschiedlich dicken Kristallstrukturen dargestellt. Dabei ist Profil2 aus einer Probe mit einer Massendicke kleiner als  $9 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^2$  bestimmt wurden. Bei Absorption von Strahlung der Energie 3.7 keV in Kalium ergibt sich nach (Zschornack, 1989) ein Absorptionskoeffizient von  $1100 \text{ cm}^2/\text{g}$  und damit nach Gleichung 4-5 ein Korrekturfaktor von  $>0.93$ . Das entspricht einer Absorption von weniger als 7% und bei einem Kontinuum von 200 einem Wert der unterhalb der statistischen Schwankungsbreite von  $\sigma = \sqrt{200} = 14$  Counts pro Kanal liegt. Um Absorptionswerte unterhalb von 1% zu erhalten,

muss die Massendicke des analysierten Bereiches unterhalb von  $1.2 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^2$  liegen. Bei einer Dichte von Kalium von etwa  $0.9 \text{ g/cm}^3$  entspricht das einer Schichtdicke von etwa 130 nm.

Profil1 wurde aus einer Probe gewonnen, die bei den von uns verwendeten Mikroskopeinstellungen mit einer Anregungsspannung von 100 kV kaum vom Elektronenstrahl durchdrungen wurde. Ihre Massendicke lag deutlich über  $1.3 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^2$  und damit die Absorption von Quanten der Energie 3.7 keV deutlich über 10%.



**Abb. 5-15** Vergleich zweier Profile von Kalium (nur  $K\beta$ -Peak dargestellt). Profil1 aus dickerer Kristallstruktur mit erkennbarer Absorptionskante und Profil2 aus dünner Kristallstruktur ( $<150 \text{ nm}$ ) aufgenommen

Deutlich sichtbar ist die bei Profil1 im Bereich der Absorptionskante von Kalium (Energien größer 3.61 keV) gegenüber Profil2 verringerte Intensität. Das ist eine Folge der Absorption von Bremsstrahlung mit diesen Energien an den Kaliumatomen des Kristalls.

Wird nun solch ein Profil zur Analyse verwendet und an Kaliumpeaks der Proben gefittet, die einen ähnlichen Verlauf wie Profil2 aufweisen, kommt es zu einer Energiedifferenz im Bereich 3.7 keV. Da gerade in diesem Bereich der Calcium- $K\alpha$ -Peak liegt, wird durch den Fit ein positiver Calciumpeak als Ausgleich der Differenz erzeugt. In Tabelle 5-1 sind Konzentrationsberechnungen mit beiden Profilen dargestellt. Dabei wird der erhebliche Fehler in der Bestimmung der Calciumkonzentration mit einem bis zu 3-fachen Wert bei der Verwendung von Profil1 deutlich.

Die Erhöhung der Kaliumkonzentration bei Verwendung von Profil1 hat mit der ebenfalls absorptionsbedingten Differenz in der Flanke des Profils zu tun, die durch einen etwas vergrößerten Fitfaktor  $c$  für Kalium und damit eine größere Kaliumkonzentration kompensiert wird. Leicht erhöhte Anteile an Calcium und Kalium wirken wiederum vergrößernd auf die Ordnungszahlkorrektur und erhöhen somit die Konzentration noch einmal.

	Profil1	Profil2
Calcium Cytosol	8.0 ± 2.1	3.0 ± 1.9
Calcium Mito.	3.2 ± 1.2	0.6 ± 1.0
Kalium Cytosol	732 ± 109	705 ± 103
Kalium Mito.	360 ± 70	349 ± 67

**Tab. 5-1** Vergleich der mit verschiedenen Profilen berechneten Konzentrationen in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> für Kalium und Calcium in Cytosol und Mitochondrien (Mito.) von Ratten. Verwendet wurden Daten eines Tieres (N=44 Messungen für Cytosol und N=50 Messungen für Mitochondrien)

Sind die Profile einmal fehlerfrei erstellt, bleiben sie gespeichert und müssen erst erneuert werden, wenn es zu grundlegenden Änderungen am Detektor oder Pulsprozessor (z.B. andere Prozesszeit) kommt.

## 5.5 Filmkorrektur

Bei der Filmkorrektur nach Gleichung 3-13 wird davon ausgegangen, dass sich die Messbedingungen zwischen den Probenmessungen und den dazugehörigen Filmmessungen nicht unterscheiden. Berücksichtigt man allerdings mögliche Schwankungen im Probenstrom, wie sie in Kapitel 4.4 beschrieben sind, muss die Korrekturformel wie folgt lauten:

$$(5-7) \quad W_{\text{Film}} = W'_{\text{Film}} \frac{t_{\text{Probe}} I_{\text{Probe}}}{t_{\text{Film}} I_{\text{Film}}}$$

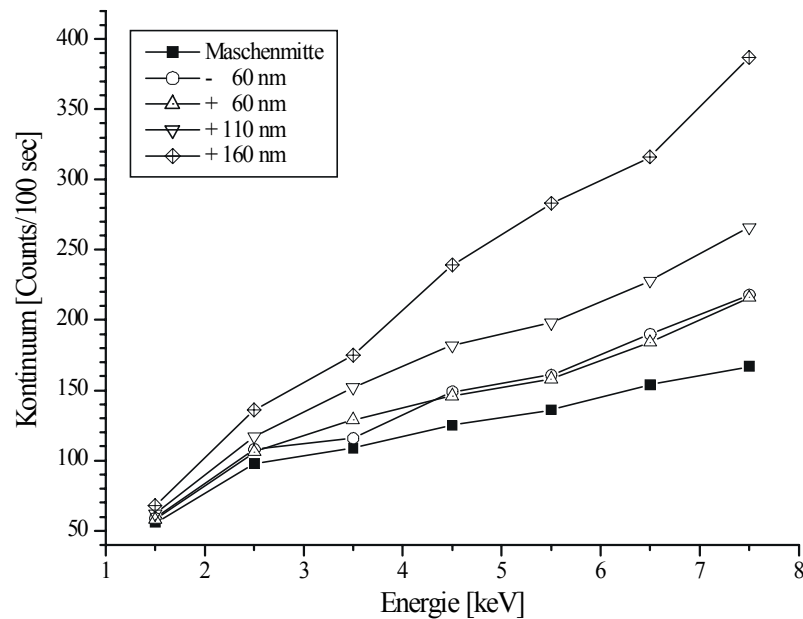
Die Zeitmessung erfolgt im Analysesystem ISIS 300 mit einer Auflösung von 1 µs, weshalb man die Fehler in der Zeitmessung (bei Messungen im Sekundenbereich) vernachlässigen kann.

Geht man davon aus, dass die Filmmessung zu Beginn der Messungen durchgeführt wurde und die Probemessung im schlechtesten Fall am Ende der Messungen, ergibt sich eine maximale Abweichung im Strom von etwa -4 % unter Standardmessbedingungen (siehe Kapitel 3.7.) und von maximal -17 % bei nicht Einhalten der Aufheizzeit der Kathode.

Da die Filmdicke innerhalb eines kleinen Bereiches kaum variiert und die Filmmessungen immer in unmittelbarer Nähe der Probenmessung durchgeführt wurden, entspricht der relative Fehler in der Konstanz des Probenstromes dem relativen Fehler in der Filmkorrektur.

## 5.6 Netzkorrektur

Die Netzkorrektur erfasst den Anteil der Kontinuumstrahlung, der durch die Kupferatome des Netzes verursacht wurde. Die Größe ist dabei vom gewählten Energieintervall und dem Abstand des Messbereiches zu einem Balken des Netzes abhängig. In Abbildung 5-16 ist das für einige Messpunkte beginnend von der Maschenmitte (etwa 210 nm vom Balken entfernt) dargestellt.



**Abb. 5-16** Durch das Netz entstehender Kontinuumanteil in Abhängigkeit von der Entfernung des Messbereiches von der Maschenmitte bei Messungen an Pioloformfilm mit einem Strahlstrom von 3.5 nA. Es wurde jeweils der Anteil für Bereiche von 1 keV Breite bestimmt.

Wie deutlich zu sehen ist, nimmt der Kontinuumanteil mit zunehmender örtlicher Annäherung an den Balken und mit zunehmendem Energieintervall stark zu. Dies beeinflusst dann auch in starkem Maße die Größe der Kontinuumkorrektur, so dass Messungen nur im zentralen Bereich der Maschen vorgenommen werden sollten. Der von uns für die Berechnungen nach der Hallmethode ausgewählte Kontinuumbereich endet bei 5 keV, da bei höheren Energien in Richtung Kupfer-K $\alpha$ -Peak (8.041 keV) der Anteil der Gridkorrektur am Gesamtkontinuum zu groß wird.

Außerdem zeigt sich, dass der zur Korrektur verwendete lineare Zusammenhang zwischen Größe des Kupferpeaks und durch das Netz verursachtem Anteil am Kontinuum in der Nähe der Balken des Netzes nicht mehr gegeben ist. Hier kommt es verstärkt zu Absorptions- und Fluoreszenzeffekten.

Einflüsse des Probenhalters sind infolge der Konstruktion der Halter für das Philips CM12 zu vernachlässigen bzw. nicht festzustellen. So sind die Halter entweder mit einer Berylliumunterlage versehen oder verfügen über Aussparungen in Richtung Detektor.

## 5.7 Einfluss der Probenzusammensetzung

Da infolge der Absorption am Detektorfenster und in der Probe die Konzentrationen der leichten Elemente nur sehr ungenau zu bestimmen sind, wird bei der Ermittlung der Elementkonzentrationen und der Ordnungszahlkorrektur mit einer sogenannten organischen Matrix gearbeitet.

Diese beinhaltet bei biologischen Präparaten den größten Teil der Masse und setzt sich bei diesen meist aus den Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff zusam-



men. Kennt man die Konzentrationen dieser Elemente in der reinen Matrix  $c_M^*$ , so gilt für die Konzentrationen der Matrixelemente  $c_M$  in der Probe:

$$(5-8) \quad c_M = \left(1 - \sum_i^N c_i\right) c_M^*$$

und

$$(5-9) \quad 1 = \sum_i^N c_i + \sum_j^{N_M} c_{Mj}$$

Dabei sind  $N_M$  Matrixelemente und  $N$  weitere Elemente, die keine Matrixelemente sind, in der Probe enthalten.

Sollen die Konzentrationen nach Gleichung 3-11 berechnet werden, muss man dafür den Korrekturfaktor nach Gleichung 3-15 berücksichtigen. Dazu werden die Konzentrationen der biologischen Matrixelemente nach 5-8 berechnet, da diese Elemente wesentlich zum Korrekturfaktor beitragen. Aus diesem Grunde ist eine möglichst exakte Vorgabe der Konzentrationsverhältnisse in der Matrix notwendig.

Für unsere Messungen an Ventrikelmyozyten der Ratte verwendeten wir als Matrix folgende Werte nach (Hall, 1979b), Protein ohne Schwefel:

Matrixelement	$c_M^*$ [g/g]	Z	A[g/mol]	$c_M^* Z^2/A$ [mol/g]
Wasserstoff	0.08	1	1	0.08
Kohlenstoff	0.48	6	12	1.44
Stickstoff	0.14	7	14	0.49
Sauerstoff	0.30	8	16	1.20
Summe:				3.21

**Tab. 5-2** Konzentrationen und Korrekturfaktoranteile der von uns verwendeten biologischen Matrix (bei einer nur aus der organischen Matrix bestehenden Probe)

Würde man statt Protein zum Beispiel Wasser mit einem Wert von  $Z^2/A=3.67$  als Matrix verwenden, käme man bei einem Matrixanteil von etwa 80-90 % zu einem Fehler von rund 10 % in der Berechnung der Elementkonzentrationen. Daher sind die jeweiligen Grundzusammensetzungen der Präparate möglichst genau in die Berechnung einzubeziehen.

## 5.8 Zählrateneffekte

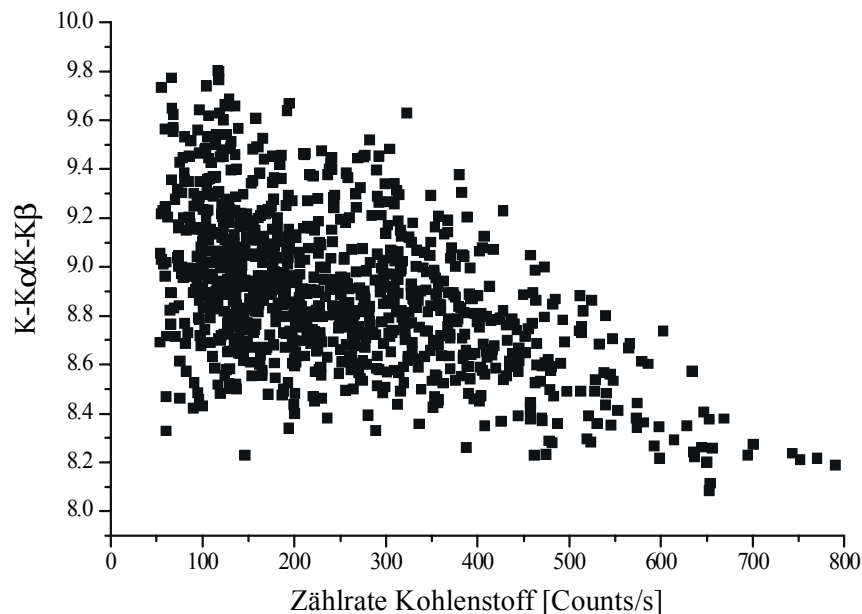
Zählrateneffekte treten auf, wenn der mittlere zeitliche Abstand zweier aufeinanderfolgender Impulse nicht mehr groß gegenüber der Impulsdauer ist. Zu den wesentlichen Zählrateneffekten gehören dabei Totzeitverluste und Impulsaufstockung.

Totzeitverluste treten auf, wenn das Analysesystem auf Grund der in zu kurzem Abstand hintereinander eintreffenden Röntgenquanten zwar erkennen kann, dass es sich um verschiedenen Impulse handelt, aber nicht in der Lage ist, diese zu verarbeiten und so in dieser Zeit keine Zählung durchführt (sogenannte Totzeit). Dies ist aber nur dann kritisch, wenn Zählraten

verschiedener Proben direkt miteinander verglichen werden sollen. In den modernen Analyse-Systemen wird die Totzeit bestimmt und neben der gesamten Messzeit noch eine sogenannte Livetime, also die Zeit, in der wirklich Röntgenquanten vom System gezählt wurden, angegeben. Mit dieser ist es dann wieder möglich, Zählraten direkt miteinander zu vergleichen. Bei der Analyse biologischer Proben nach der Hall-Methode spielt das keine Rolle, da hier ein Verhältnis zweier über die gleiche Zeit ermittelter Größen (Peakintegral und Kontinuumintegral) verwendet wird.

Der andere mögliche Effekt ist die Impulsaufstockung (engl.: pulse pile up). Impulsaufstockung findet statt, wenn ein zweiter Impuls ankommt, während sich die Verarbeitung des ersten Impulses noch in dessen Anstiegszeit vor seinem Maximum befindet. Es bildet sich dadurch ein Summenimpuls, der durch das Analysesystem einer Energie zugeordnet wird, die sich zwischen der Energie für den ersten Impuls alleine und der Energie für die Summe aus beiden Impulsen befindet. So kann es einen Beitrag zum Kontinuum geben oder zur Ausbildung kleiner Summenpeaks (pile-up-Linien) kommen. Außerdem gehen die beiden Impulse natürlich ihren ursprünglichen Linien verloren, so dass diese zu gering gezählt werden.

Die hauptsächlichsten in unseren biologischen Proben auftretenden Elemente sind die leichten Elemente Kohlenstoff und Sauerstoff und als Ion Kalium. Um nun zu untersuchen, ob es zählratenabhängige Effekte bei unseren Messungen gab, wurde in Abbildung 5-17 das Verhältnis zwischen Höhe des Kalium-K $\alpha$ -Peaks und Höhe des Kalium-K $\beta$ -Peaks in Abhängigkeit von der vom Analysesystem registrierten Kohlenstoffrate aufgetragen. Dies ist deshalb eine interessante Größe, da die Energien der Linien mit 3.311 keV für Kalium-K $\alpha$ , 0.277 keV für Kohlenstoff und 3.590 keV für Kalium-K $\beta$  sich genau zur Summe ergänzen.

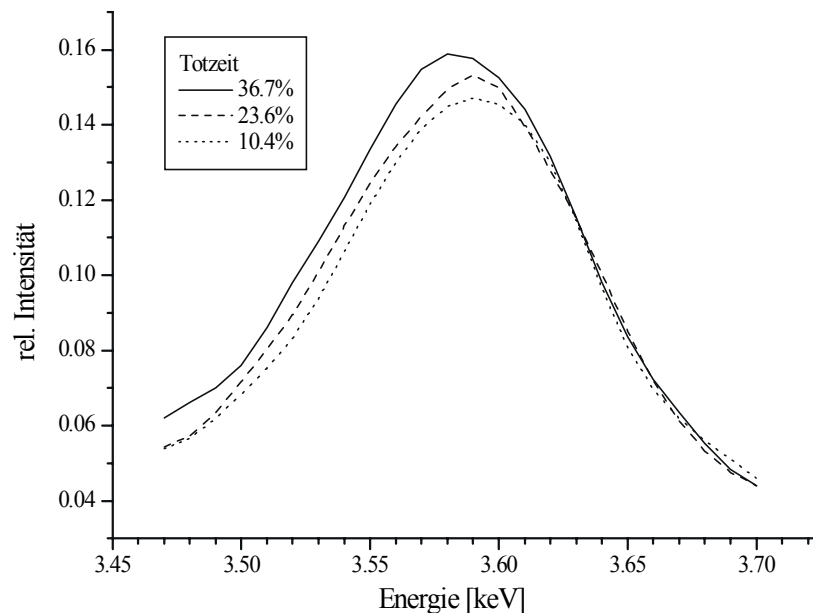


**Abb. 5-17** Abhängigkeit des Verhältnisses zwischen der Intensität des Kalium-K $\alpha$ -Peaks und der Intensität des Kalium-K $\beta$ -Peaks ( $K-K\alpha/K-K\beta$ ) von der Zählrate für Kohlenstoff. Dargestellt sind 966 Einzelmessungen an Mitochondrien und Cytosol von Rattenventrikelmyozyten.

Wie deutlich in Abbildung 5-17 zu sehen ist, kommt es zu einer Verkleinerung des Verhält-

nisses der Höhe des Kalium-K $\alpha$ -Peaks zur Höhe des Kalium-K $\beta$ -Peaks. Für kleinere Zählraten von Kohlenstoff treten größere Schwankungen im Verhältnis auf, da bei gleicher Messzeit eine schlechtere Zählstatistik vorhanden ist. Mit zunehmender Zählrate für Kohlenstoff sinkt allerdings der Mittelwert des Peakverhältnisses, so dass eine eindeutige Abhängigkeit sichtbar wird. Da die Zusammensetzung der biologischen Proben relativ konstant hinsichtlich der Zusammensetzung an Kalium und Kohlenstoff ist und die Probenbeschichtung über einen Schichtdickenmesser immer konstant gehalten wurde, muss hier der Effekt der Impulsaufstockung vorliegen.

Um dies genauer zu untersuchen, wurde an der gleichen Probe der Strahlstrom variiert und so eine veränderte Zählrate am gleichen Messobjekt erzeugt. Als Maß für den Zählrateneinfluss wurde die Totzeit verwendet, da diese in dem von uns verwendeten Analysesystem sehr genau bestimmt wird und auch während der Messung ablesbar ist. Abbildung 5-18 zeigt den Verlauf des Kalium-K $\beta$ -Peaks für 3 verschiedenen Totzeiten. Die Amplitude ist dabei auf die Höhe des Kalium-K $\alpha$ -Peaks normiert.



**Abb. 5-18** Kalium-K $\beta$ -Peak für verschiedene Totzeiten, relative Intensität im Vergleich zum Kalium-K $\alpha$ -Peak

Deutlich sichtbar kommt es zu einer Erhöhung der Intensitäten in den Energiebereichen zwischen 3.62 keV und dem Kalium-K $\alpha$ -Peak. Dies zeigt sich besonders deutlich für Totzeiten über 20% der Gesamtmesszeit.

Da der Kaliumpeak und insbesondere der Kalium-K $\beta$ -Peak wegen der Überlappung mit dem Calcium-K $\alpha$ -Peak eine wesentliche Rolle bei der Bestimmung der Calciumkonzentration spielt, ist dieser Effekt zu berücksichtigen. So sollten nur Messungen mit verhältnismäßig niedrigen Zählraten durchgeführt werden, da die Impulsaufstockung proportional dem Produkt aus Zählrate von Kalium und Zählrate von Kohlenstoff ist (Maß für die Wahrscheinlichkeit des gleichzeitigen Eintreffens eines Kohlenstoff- und eines Kaliumquants). Die notwendige Zählstatistik kann über eine längere Messzeit bei geringerem Strom realisiert werden. Weiterhin sollte das Kaliumprofil für die Auswertung der Spektren unter gleichen Verhältnis-

sen von Kohlenstoff und Kalium, wie dann in den Spektren vorhanden, gewonnen werden, um hier Unterschiede zu vermeiden.

### **5.9 Negative Konzentrationen**

Negative Konzentrationen sind vom biologischen Standpunkt aus gesehen nicht möglich. Durch den Einfluss der statistischen Fluktuationen auf die Analyse kommt es allerdings bei sehr kleinen Konzentrationen nahe Null dazu, dass die Auswertung des einzelnen Spektrums eine negative Konzentration als Ergebnis liefern kann.

Nun müssen diese Konzentrationen bei der Mittelwertbildung berücksichtigt. Setzt man sie gleich Null, wird die statistische Verteilung verändert und der berechnete Mittelwert kann nicht mehr als Schätzung des Erwartungswertes der Verteilung der Messwerte aufgefasst werden.

## 6 Messungen an Ventrikelmyozyten der Ratte

Das wesentliche Interesse bei den Messungen an der Ratte galt den Unterschieden in der Zusammensetzung der Elementkonzentrationen der Kompartimente bei normalen Ratten (Stamm Whistar Kyoto, WKY) und Ratten mit genetisch bedingtem arteriellen Bluthochdruck und damit verbundener Hypertrophie des linken Ventrikels (Spontan Hypertensive Rats, SHR). Diese Hypertrophie äußert sich vor allem in einer Vergrößerung des Volumens der einzelnen Zellen. Vergleichende Messungen der wesentlichen Zellparameter zur Beschreibung der morphologischen und physiologischen Unterschiede sind in Tabelle 6-1 enthalten.

Parameter	SHR	WKY	
systolischer Blutdruck [mmHg]	227 ± 2	133 ± 1	**
Herzfrequenz [1/min]	398 ± 4	324 ± 3	
Herz-/Körpergewicht [mg/g]	7.2 ± 0.4	5.25 ± 0.2	**
Zelllänge [µm]	159 ± 5	125 ± 4	**
Zellbreite [µm]	28 ± 1	23 ± 1	*
Zellvolumen [pl]	103 ± 9	56 ± 5	**
Membranpotential [mV]	-75 ± 1	-76 ± 1	

**Tab. 6-1** Physiologische und morphologische Parameter der untersuchten Ratten. Gegeben ist jeweils der Mittelwert mit seinem Standardfehler (SEM) für jeweils 10 Tiere. \* bedeutet signifikanter Unterschied auf dem 0.05 Niveau und \*\* auf dem 0.001 Signifikanzniveau.

Im Folgenden wird hauptsächlich auf die Bestimmung der mittleren Konzentration für das Element Calcium unter Berücksichtigung der oben diskutierten Fehlereinflüsse und möglicher biologischer Abhängigkeiten eingegangen. Es werden dabei sowohl das Kompartiment Cytosol als auch die Mitochondrien getrennt nach WKY und SHR betrachtet und verglichen. Hierbei geht es darum, inwieweit sich die in Tabelle 6-1 dargestellten morphologischen und physiologischen Unterschiede auf die Calciumkonzentration in den einzelnen Kompartimenten auswirken.

In Tabelle 6-2 sind die Anzahlen der nach Begutachtung der elektrophysiologischen Protokolle für verwendbar befundenen Messungen angegeben. Erst während der Messungen hatte sich herausgestellt, dass es einen Zusammenhang zwischen hohen Natrium- und niedrigen Kaliumkonzentrationen im Zellinneren (wie bei geschädigten Zellen) und dem beim Versuch aufgenommenen Protokoll des Stroms über die Zellmembran gab, so dass einige Messungen verworfen werden mussten.

Kompartiment	WKY	SHR
Cytosol	242	237
Mitochondrien	262	256

**Tab. 6-2** Anzahl der an Ventrikelmyozyten von SHR- und WKY-Ratten durchgeführten und zur Berechnung der Elementkonzentration zur Verfügung stehenden Messungen

Eine Analyse der Massendickenverhältnisse (Massendicke von Mitochondrien zur Massendicke des Cytosols des gleichen Schnittes, MDV) von SHR- und WKY-Ratten ergab keinen Unterschied (SHR:  $MDV=2.43\pm 0.53$ , Mittelwert $\pm$ SD bei 29 Messungen und WKY:  $MDV=2.46\pm 0.60$ , Mittelwert $\pm$ SD bei 27 Messungen), so dass im Folgenden immer die Konzentrationen pro Kilogramm Trockenmasse ( $\text{mmol} (\text{kg d.w.})^{-1}$ ) direkt miteinander verglichen werden können.

### 6.1 Dosisabhängigkeit der Elementkonzentrationen

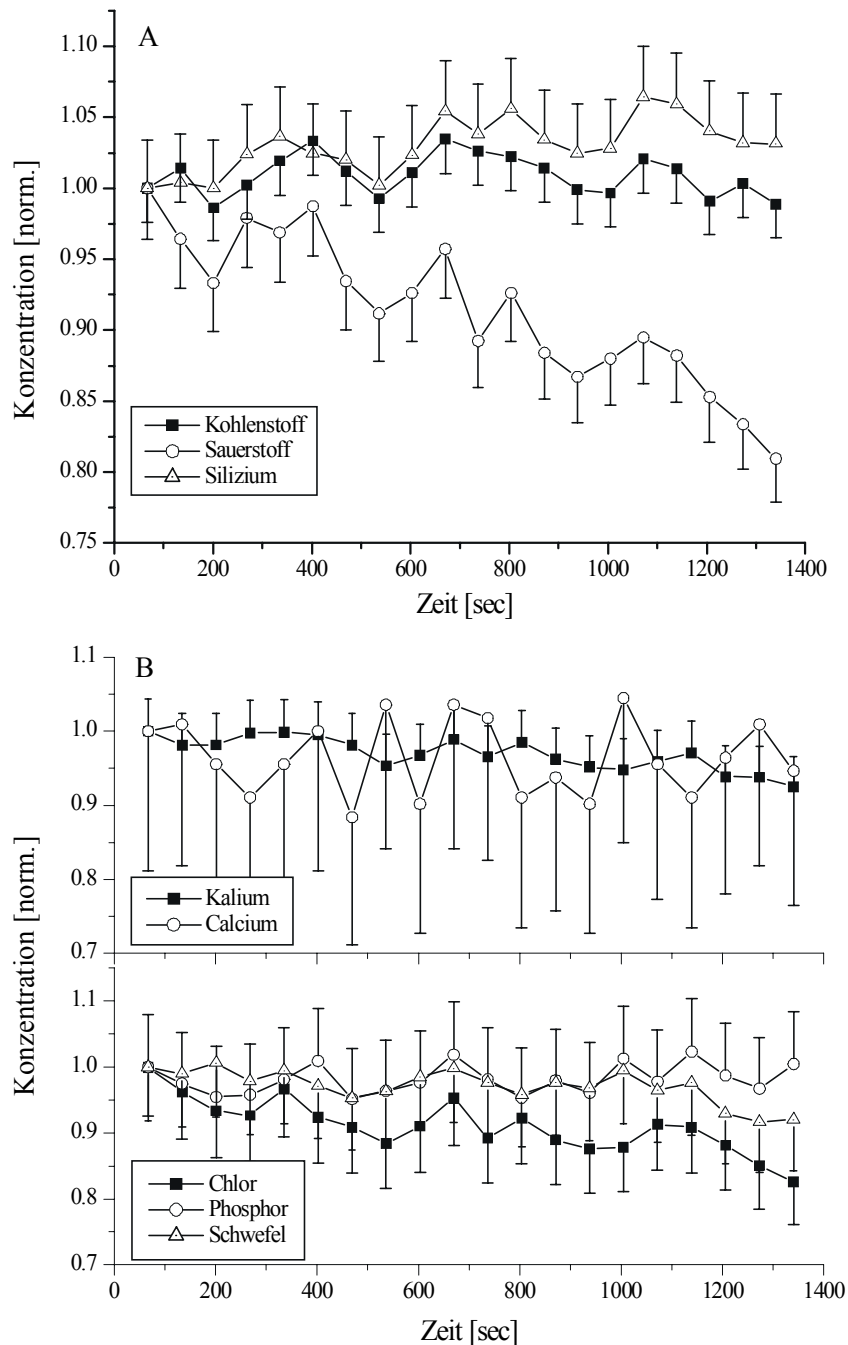
Vor der fehlerabhängigen Elementanalyse soll erst einmal, analog zu den Betrachtungen bei den Messungen an Standards, die Wirkung des Elektronenstrahls auf das Verhalten der Elementkonzentrationen bei Messungen an Cytosol und Mitochondrien betrachtet werden. Dabei wurden die bei uns typischerweise verwendeten Parameter (Strahlstrom 3.5 nA, Scanbereich für Cytosol etwa  $300\times 300 \text{ nm}^2$ , Scanbereich für Mitochondrien etwa  $80\times 80 \text{ nm}^2$ ) für jeweils 5 Messungen fest eingestellt und der Verlauf der Konzentration der verschiedenen Elemente in Abhängigkeit von der Zeit untersucht.

In Abbildung 6-1 sind die Zeitverläufe für Messungen am Cytosol dargestellt. Dabei wurden die Konzentrationen jeweils auf die Konzentration zu Beginn der Messung (Mittelwert für die erste Minute) bezogen. Für alle dargestellten Elemente beträgt die Konzentration nach den von uns üblicherweise verwendeten 1000 Sekunden Messzeit noch über 85 % des Wertes für die erste Minute. Ein deutlicher Abfall mit der Zeit (Dosis) zeigt sich vor allem für Sauerstoff. Die Calciumkonzentration bleibt relativ stabil (kleine Konzentration (etwa  $3 \text{ mmol} (\text{kg d.w.})^{-1}$ ), daher große Standardabweichungen). Der Abfall in der Kaliumkonzentration beträgt weniger als 5 %, und der Masseverlust an Chlor bleibt für 1000 Sekunden Messzeit unterhalb 15 %. Zusätzlich lässt sich eine leichte Erhöhung des Anteils an Silizium beobachten, welche aber unterhalb 10 % bleibt.

Ein etwas anderes Bild ergibt sich beim gleichen Strahlstrom und der gleichen Messzeit für die Messungen an Mitochondrien. Auf Grund der um den Faktor 14 kleineren Fläche, wird in die Mitochondrien pro Zeit- und Flächeneinheit eine 14 mal größere Elektronendosis eingebracht. Der damit verbundene gegenüber den Messungen am Cytosol erhöhte Masseverlust wird in Abbildung 6-2 sichtbar.

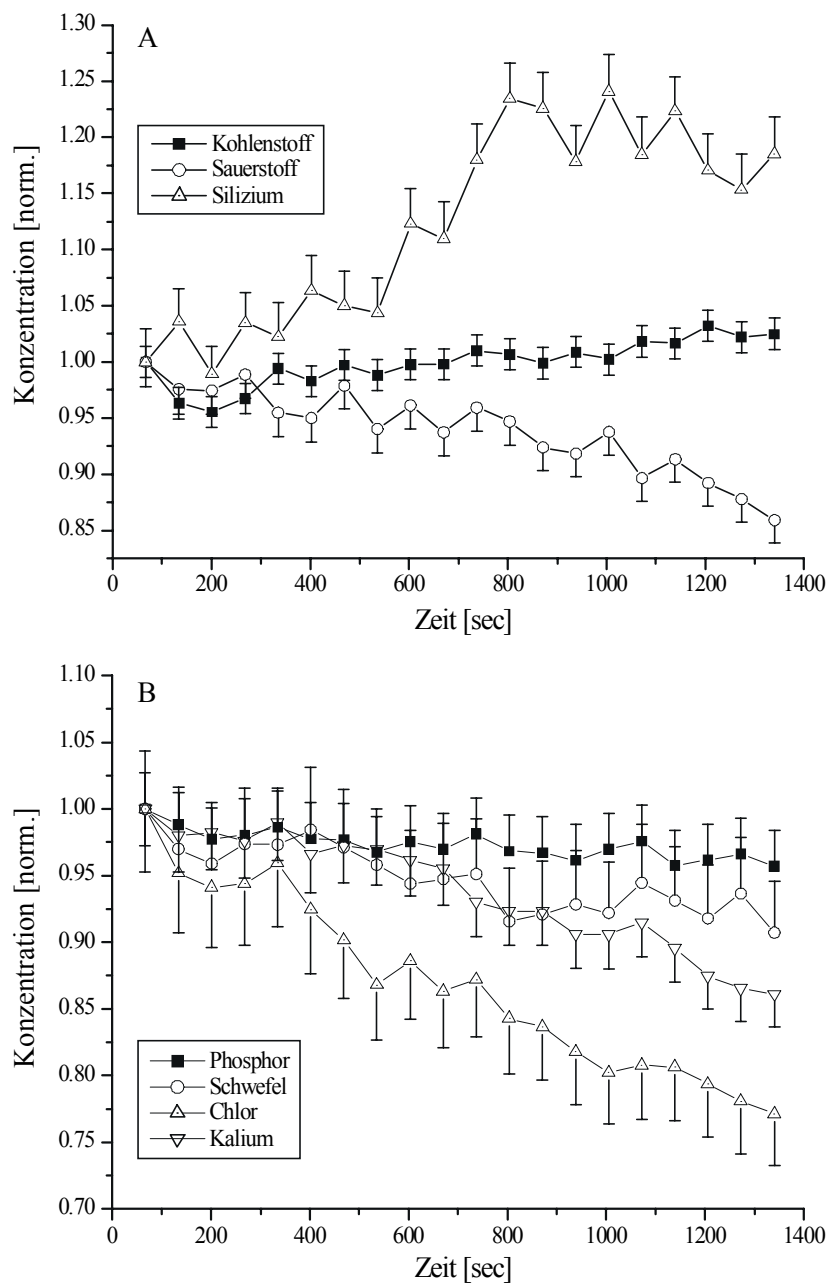
Nach 1000 Sekunden hat sich die Kaliumkonzentration trotz Kühlung bereits um 10 % reduziert und die Chlorkonzentration beträgt nur noch 80 %. Weiterhin zeigt sich ein größerer Masseverlust bei Sauerstoff. Wenig Änderung ergibt sich für die zum größten Teil in Proteinen und Lipiden gebundenen Elemente Phosphor und Schwefel. Wie schon bei den Messungen am Cytosol zu beobachten, nur noch etwas ausgeprägter, kommt es zu einer Ansammlung von Silizium. Diese 25 % Erhöhung der Siliziumkonzentration sind aber relativ zu betrachten, da die mittlere Siliziumkonzentration bei den Mitochondrienmessungen im Vergleich zu den Messungen am Cytosol wesentlich kleiner ist (siehe Kapitel 4.1).

Da Mitochondrien eine wesentliche höhere Massendicke aufweisen als das Cytosol (siehe Kapitel 4.9) ergibt sich bei gleichem Strahlstrom eine höhere Quantenausbeute, so dass z.B. für die Chloranalyse ohne wesentliche Erhöhung des stochastischen Fehlers die Messzeit auf 600-800 Sekunden reduziert werden könnte, um den Masseverlust zu verringern.

**Abb. 6-1**

A: Verlauf der zeitabhängigen Konzentrationen normiert auf den Messwert nach 60 Sekunden für die Matrixelemente Kohlenstoff und Sauerstoff, sowie das externe Element Silizium bei cytosolischen Messungen an Ventrikelmyozyten der Ratte

B: Elementkonzentration mit Standardabweichung für die Probenelemente Kalium, Calcium, Chlor, Phosphor und Schwefel; alle Messpunkte sind Mittelwerte für jeweils 60 Sekunden Messzeit bei 5 Proben normiert auf den Messpunkt nach 60 Sekunden

**Abb. 6-2**

A: Verlauf der zeitabhängigen Konzentrationen normiert auf den Messwert nach 60 Sekunden für die Matrixelemente Kohlenstoff und Sauerstoff, sowie das externe Element Silizium bei Messungen an Mitochondrien von Ventrikelmyozyten der Ratte  
 B: Elementkonzentrationen mit Standardabweichung für die Probenelemente Kalium, Chlor, Phosphor und Schwefel; alle Messpunkte sind Mittelwerte für jeweils 60 Sekunden Messzeit bei 5 Proben und normiert auf den Messpunkt nach 60 Sekunden



## 6.2 Einfluss von Top-Hat-Filter, Siliziumkorrektur und Detektorfunktion

Die Auswirkung von systematischen und statistischen Fehlern auf die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messungen an den Kompartimenten Cytosol (Cyto) und Mitochondrien (Mito) von Ratten der Stämme WKY und SHR wurden jeweils mit dem t-Test verglichen. Die folgenden Tabellen enthalten daher neben den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ , die Anzahl der jeweiligen Messungen (N), die Differenz der Mittelwerte (Diff.) in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ , den t-Wert der „Student“ t-Verteilung (berechnet nach Gleichung 3-32) und die zu diesem t-Wert gehörende Überschreitungswahrscheinlichkeit P. Das bedeutet, die verglichenen Mittelwerte sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\geq P$  signifikant voneinander verschieden.

### Top-Hat-Filter

Zuerst wurden die Konzentrationsverteilungen für verschiedene Einstellungen des Top-Hat-Filters ermittelt. Dabei wurde der in Kapitel 5.2.1 bestimmte optimale Filter zur Berechnung der Calciumkonzentration für die weitere Datenauswertung nicht verwendet, da er zwar die optimale Lösung zur Bestimmung der Calciumkonzentration ist, aber wegen seiner inneren Breite größere Probleme bei der Bestimmung von Natrium (Überlagerung mit der Kupfer-L-Linie) und Phosphor (starke Abweichung bei großem Siliziumpeak) bereitet. Diese Elemente sind in mehr oder weniger großer Konzentration in allen Kompartimenten der Zelle vorhanden und beeinflussen über die Bestimmung der Ordnungszahlkorrektur auch die anderen Elementkonzentrationen. Zur Bestimmung von Überlagerungseinflüssen (siehe Kapitel 4.5) ist die genaue Kenntnis von Natrium und Phosphorkonzentration nötig. Wie Kapitel 5.2.1 zeigt, wirkt sich der Filter in einem gewissen Bereich nicht auf die Calciumkonzentration an sich aus, sondern über seine glättende Eigenschaft nur auf die Breite der Verteilung. Wählt man jetzt einen Filter, der etwas kleiner ist als der berechnete optimale Filter, vergrößert sich die Standardabweichung des Mittelwertes der Calciumkonzentration minimal, aber die anderen Elemente werden exakter bestimmt.

Daher wurde in Anlehnung an (Statham, 1977) ein Filter verwendet, der in etwa die Ausdehnung der Auflösung des Detektors (laut Definition über die FWHM bei Mn-K $\alpha$ ) besitzt. Er hat die Dimension: innere Breite m=7 Kanäle, äußere Breite n=8 Kanäle (Kanalbreite 10 eV). Die mit diesem Filter (THF 7;8) berechneten Werte werden im Folgenden mit einem Filter verglichen, welcher der Empfehlung von (Laquerriere *et al.*, 2001) folgend an die FWHM von Kalium angelehnt ist und die Dimension m=5, n=6 besitzt (THF 5;6) (Tabelle 6-3).

	WKY $\pm$ SD	N	SHR $\pm$ SD	N	Diff.	t-Wert	P
Mito THF 7;8.	0.37 $\pm$ 1.17	262	0.58 $\pm$ 1.00	249	-0.21	2.18	0.030
Mito THF 5;6.	0.40 $\pm$ 1.25	262	0.60 $\pm$ 1.13	249	-0.20	1.89	0.059
Cyto THF 7;8	2.75 $\pm$ 1.86	241	2.98 $\pm$ 2.16	229	-0.23	1.24	0.216
Cyto THF 5;6	2.77 $\pm$ 1.98	241	3.00 $\pm$ 2.41	229	-0.23	1.13	0.258

**Tab. 6-3** Vergleich der Mittelwerte der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ , berechnet mit verschiedenen Top-Hat-Filtern

Aus Tabelle 6-3 wird deutlich, dass sich die Veränderung des Top-Hat-Filters in diesem Bereich, wie auch bei den Simulationsrechnungen in Kapitel 5.2.1 ermittelt, nicht auf die mittlere Konzentration auswirkt (maximale Differenz  $0.03 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ).

Mit dem Wechsel von THF 5;6 auf THF 7;8 ergibt sich allerdings eine Verringerung in der Standardabweichung um  $0.08$  bis  $0.13 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  für Mitochondrien und  $0.12$  bis  $0.25 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  für die Messungen im Cytosol. Das entspricht in etwa den theoretisch vorausgerechneten Verbesserungen von  $0.11 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  für simulierte Spektren mit einem Kontinuum und einer Kaliumkonzentration ähnlich der von Messungen an Mitochondrien (Abb. 5-6, Standardabweichung für THF 5;6  $0.83 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  und für THF 7;8  $0.72 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ). Analog fällt der Vergleich für Messungen am Cytosol aus, wo die aus simulierten Spektren mit ähnlichen Verhältnissen berechneten Standardabweichungen  $1.22 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  für einen Top-Hat-Filter von 7;8 und  $1.41 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  für einen THF von 5;6 betragen und sich somit eine Verringerung von  $0.19 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  ergibt.

Verwendet man ein Signifikanzniveau von  $\alpha=0.05$  bei der Frage, ob sich die Mittelwerte der Messungen an SHR und WKY unterscheiden, ergibt sich bei Verwendung des THF 5;6 keine Signifikanz, wohl aber eine für Mitochondrien bei einem THF von 7;8, da  $p$  in diesem Falle mit  $p=0.03$  kleiner als  $\alpha$  ist.

#### Siliziumkontamination

Da die Ursache der Siliziumkontamination (siehe Kapitel 4.1) zu Beginn der Messungen an Ventrikelmyozyten der Ratte noch nicht bekannt war und deshalb nicht vermieden werden konnte, gibt es viele Messungen mit Siliziumkontamination und einige ohne.

Vergleicht man nun die mit dem Top-Hat-Filter 7;8 berechneten Werte mit Siliziumkorrektur (mit SiK) mit denen ohne Siliziumkorrektur (ohne SiK), ergibt sich Tabelle 6-4 (zur Korrektur der Siliziumkontamination siehe Kapitel 4.1.2).

	WKY $\pm$ SD	N	SHR $\pm$ SD	N	Diff.	t-Wert	P
Mito mit SiK	$0.37 \pm 1.17$	262	$0.58 \pm 1.00$	249	-0.21	2.18	0.030
Mito ohne SiK	$0.35 \pm 1.10$	262	$0.55 \pm 0.95$	249	-0.20	2.19	0.029
Cyto mit SiK	$2.75 \pm 1.86$	241	$2.98 \pm 2.16$	229	-0.23	1.24	0.216
Cyto ohne SiK	$2.38 \pm 1.64$	241	$2.67 \pm 1.96$	229	-0.29	1.74	0.082

**Tab. 6-4** Vergleich der Mittelwerte der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$  berechnet mit Siliziumkorrektur nach Gleichung 4-1 (mit SiK) und ohne Korrektur für Siliziumkontamination (ohne SiK)

Betrachtet man die Mittelwerte in Tabelle 6-4, zeigt sich bei den Mitochondrien kaum eine Veränderung zwischen den Werten mit und ohne Siliziumkorrektur. Bei den Mittelwerten der Messungen an Cytosol ergibt sich eine Erhöhung des Mittelwertes mit Siliziumkorrektur um etwa 10%.

Die Standardabweichungen sind für alle Messungen mit Siliziumkorrektur deutlich höher. Bei einer Fehlerkorrektur erwartet man eigentlich das Gegenteil und zwar eine Verringerung der Streuung der Werte. Da die Calciumkonzentrationen aber sehr klein sind und auf Grund der statistischen Schwankungen auch negative Werte auftreten, führt hier eine einfache Multiplikation mit einem Korrekturfaktor zu einer Vergrößerung der Streuung der Messwerte.

Um den Effekt der Siliziumkorrektur richtig zu charakterisieren, betrachten wir die Kaliumkonzentrationen im Cytosol (Tabelle 6-5).

	WKY $\pm$ SD	N	SHR $\pm$ SD	N	Diff.	t-Wert	P
Cyto mit SiK	703.4 $\pm$ 147.2	241	710.5 $\pm$ 142.4	229	-7.1	0.53	0.596
Cyto ohne SiK	610.6 $\pm$ 144.3	241	638.2 $\pm$ 162.3	229	-27.6	1.95	0.052

**Tab. 6-5** Vergleich der Mittelwerte der Kaliumkonzentrationen im Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> berechnet mit Siliziumkorrektur nach Gleichung 4-1 (mit SiK) und ohne Korrektur für Siliziumkontamination (ohne SiK)

Hier ergibt sich ohne Siliziumkorrektur ein signifikanter Unterschied zwischen SHR und WKY-Ratten auf dem Niveau von  $\alpha=0.1$ . Dabei liegt der Mittelwert für die SHR-Ratten über dem der WKY-Ratten und die Standardabweichung ist auch wesentlich größer. Das hat seine Ursache darin, dass die Messungen an WKY-Ratten ausschließlich mit siliziumhaltigen Netzen erfolgten, wogegen bei den Messungen an SHR-Ratten auch Netze ohne Siliziumkontamination verwendet wurden.

Verwendet man nun die Siliziumkorrektur, gleichen sich die Mittelwerte der Kaliumkonzentrationen im Cytosol von SHR und WKY-Ratten an, und es besteht kein signifikanter Unterschied mehr. Dies ist physiologisch auch zu erwarten, da es zwischen den SHR und WKY-Ratten weder Unterschiede in der Massendicke (siehe Kapitel 4.9) und damit im Wassergehalt, noch im Membranpotential gab. Dies sind aber die wesentlichen Punkte, die zu einer Änderung der cytosolischen Kaliumkonzentration führen würden.

Betrachtet man nun die Standardabweichung, ergibt sich mit Siliziumkorrektur für die SHR Ratten schon eine Verringerung im Absolutwert. Aber auch bei den WKY-Ratten nimmt mit der Siliziumkorrektur die Streuung der Messwerte ab, da man bei einer Korrektur mittels eines Faktors die relativen Werte zum Vergleich heranziehen muss. Hier ergibt sich ohne Siliziumkorrektur ein relativer Wert der Standardabweichung von 23.6% für WKY und 25.4% für SHR und mit Korrektur von 20.9% für WKY und 20.0 für SHR.

### Detektorfunktion

Es soll nun noch der Einfluss in der Variation von Peakposition und Veränderungen der Detektorauflösung (siehe Kapitel 4.7) betrachtet werden. Dazu werden die mittels Korrektur für Veränderungen der Detektorfunktion (mit K) (siehe Kapitel 3.3.2) berechneten Werte mit denen ohne Korrektur (ohne K) verglichen (Tabelle 6-6). Alle Berechnungen erfolgten dabei wieder mit dem Top-Hat-Filter 7;8 und unter Einbeziehen der Siliziumkorrektur.

	WKY $\pm$ SD	N	SHR $\pm$ SD	N	Diff.	t-Wert	P
Mito mit K	0.37 $\pm$ 1.17	262	0.58 $\pm$ 1.00	249	-0.21	2.18	0.030
Mito ohne K	0.04 $\pm$ 1.24	262	0.24 $\pm$ 1.05	249	-0.20	1.96	0.050
Cyto mit K	2.75 $\pm$ 1.86	241	2.98 $\pm$ 2.16	229	-0.23	1.24	0.216
Cyto ohne K	2.48 $\pm$ 1.99	241	2.73 $\pm$ 2.25	229	-0.25	1.28	0.202

**Tab. 6-6** Vergleich der Mittelwerte der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> berechnet mit Korrektur für Änderungen der Detektorfunktion (mit K) und ohne Korrektur (ohne K)

Wenn keine Korrektur verwendet wird, sind die Verschiebungen der Calciumkonzentrationen hin zu kleineren Werten sowie erhöhte Standardabweichungen deutlich sichtbar. Betrachtet man die bei der Korrektur ermittelten mittleren Abweichungen in der Position des Kaliumpeaks von  $-0.45 \pm 0.38$  eV für Messungen in Mitochondrien (511 Messungen) und von  $-0.33 \pm 0.48$  eV für Messungen im Cytosol (470 Messungen) im Vergleich zum verwendeten Kaliumprofil, wird die Verkleinerung der Calciumkonzentration verständlich. Eine Linksverschiebung des Kaliumpeaks auf der Energieskala führt zu einer negativen Differenz von Spektrum und Profil im Bereich des Calciumpeaks, welche der MLSQ-Fit mit einer Verkleinerung des Calciumpeaks ausgleicht. Die mittleren Veränderungen in der Detektorauflösung von  $-0.1 \pm 0.3$  eV können bei einer FWHM von etwa 100 eV vernachlässigt werden.

Für die durchgeführte Korrektur mit der Einbeziehung der ersten und zweiten Ableitung in den MLSQ-Fit lässt sich für die ermittelten geringen Abweichungen nach Kapitel 5.3.1 und 5.3.2 abschätzen, dass keine zusätzlichen Auswirkungen auf die Calciumkonzentrationen zu erwarten sind.

Die maximalen gemessenen Abweichungen der Detektorfunktion zur Zeit der Spektrenaufnahme von der Detektorfunktion zur Zeit der Erstellung der Profile betrug für die Position des Kaliumpeaks  $+1.64$  eV und  $-1.51$  eV und für die Auflösung  $+1.3$  eV und  $-1.5$  eV. Die für diese Werte bei der Simulation errechneten Abweichungen der Calciumkonzentration vom vorgegebenen Wert lagen unterhalb  $0.05$  mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 5-13 und Abbildung 5-14).

### 6.3 Einfluss von Überlagerungen im Messbereich

Wie in Kapitel 4.5 dargestellt, kann es zur fehlerhaften Konzentrationsbestimmung in einem Kompartiment kommen, wenn im Messbereich andere Kompartimente oder Teile des Extrazellularraumes überlagert sind (siehe Tabellen 4-1 und 4-2). Grobe Überlagerungen durch gefaltete oder gerollte Bereiche des Schnittes kann man bei der Auswahl der Messvolumina ausschließen. Sehr hilfreich dabei ist die Betrachtung im STEM-Bild (Hell- oder Dunkelfeld) bei Kippung der Probe, um einen quasi 3-dimensionalen Eindruck der Lage des Schnittes zu erhalten. Überlagerungen durch benachbarte Kompartimente können ausgeschlossen werden, wenn man den Messbereich entsprechend Kapitel 4.5 zur Kippachse orientiert und ausreichend Abstand zum Rand des Kompartiments lässt.

Nicht aus dem elektronenmikroskopischen Bild auszuschließen sind Überlagerungen, die auftreten können, wenn sich die Lösung des Extrazellularraumes beim Kryoschneiden in kleinen Stücken über dem Zellschnitt verteilt. Dies kann der Fall sein, wenn der Extrazellularraum infolge einer verringerten Albuminkonzentration und durch schlechten Kontakt beim Einfrieren mit sehr großen Eiskristallen versetzt ist und damit nach dem Gefriertrocknen keinen einheitlichen zusammenhängenden Schnitt mehr bildet. Solche Überlagerungen sind vor allem auf den in ihrem Kontrast sehr einheitlichen Mitochondrien schwer zu erkennen. Weiterhin sind dünne Querschnitte des Cytosols infolge fehlender Möglichkeiten der Strukturzuordnung und wegen großer Löcher durch Eiskristallbildung beim Einfrieren problematisch.

Als einzige Möglichkeit bleibt dafür, ein Ausschlussverfahren über die im Vergleich zum Mittelwert aller Messwerte veränderten Konzentrationen. So ergeben sich bei einer Überlagerung nach Tabellen 4-1 und 4-2 erhebliche Erhöhungen der Konzentrationen von Natrium und Chlor infolge des hohen Anteils an NaCl in der die Zelle umgebenden Lösung. Als weiteren

Indikator muss man die Absenkung der Kaliumkonzentration auf Grund der großen Konzentrationsdifferenz zwischen Intra- und Extrazellularraum verwenden. So kann ausgeschlossen werden, dass die Erhöhungen in Chlor und Natrium infolge eines veränderten Wassergehaltes auftreten, da dann alle Konzentrationen erhöht sein müssten.

Es sind aber auch physiologische Erhöhungen der intrazellulären Natrium und Chlorkonzentrationen möglich, z.B. bei einem energiemangelbedingten Zusammenbruch des Membranpotentials oder während eines Aktionspotentials. Daher wird im Folgenden als Grenzkonzentration für mit hoher Wahrscheinlichkeit überlagerte Messungen angesetzt: Die Konzentrationen für Natrium und Chlor müssen den jeweiligen 10%-igen Überlagerungswert aus Tabelle 4-1 (Cytosol) oder Tabelle 4-2 (Mitochondrien) überschreiten, und zusätzlich muss die Kaliumkonzentration den dazugehörigen Wert unterschreiten.

Tabelle 6-7 zeigt den Vergleich zwischen den mittleren Konzentrationen aller Messungen (alle), den Messungen, die den Überlagerungskriterien entsprechen (über) und den restlichen Messungen ohne überlagerte Messungen (ohne).

	WKY $\pm$ SD	N	SHR $\pm$ SD	N	Diff.	t-Wert	P
Mito alle.	0.37 $\pm$ 1.17	262	0.58 $\pm$ 1.00	249	-0.21	2.18	0.310
Mito über	1.81 $\pm$ 2.01	8	0.86 $\pm$ 0.98	6	0.95	1.06	0.310
Mito ohne	0.33 $\pm$ 1.11	254	0.57 $\pm$ 1.00	243	-0.24	2.53	0.012
Cytosol alle	2.75 $\pm$ 1.86	241	2.98 $\pm$ 2.16	229	-0.23	1.24	0.216
Cytosol über	3.53 $\pm$ 2.13	15	3.74 $\pm$ 2.07	6	-0.21	0.21	0.839
Cytosol ohne	2.69 $\pm$ 1.84	226	2.96 $\pm$ 2.16	223	-0.27	1.43	0.154

**Tab. 6-7** Vergleich der Mittelwerte der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> berechnet für alle Messungen (alle) mit Lösung aus Extrazellularraum überlagerte (über) und nicht überlagerte (ohne) Messungen

Wie aus den Tabellen für die Überlagerung zu erwarten, kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung der Calciumkonzentrationen. Da die Anzahlen der überlagerten Messungen klein sind, was für eine gute Vorauswahl der Messstellen spricht, sind die Abweichungen von den Tabellenwerten stochastisch bedingt. Würde man die Betrachtungen hier beenden, ergäbe sich ein signifikanter Unterschied der Calciumkonzentrationen in Mitochondrien von SHR und WKY auf einem Signifikanzniveau von  $<0.02$ .

#### 6.4 Einfluss der Schnittdicke

Die Schnittdicke kann auf unterschiedliche Weise zu einer Beeinflussung der gemessenen Konzentrationen führen. Dabei sind sowohl sehr dünne als auch extrem dicke Schnitte (bezogen auf die am Kryomikrotom eingestellte Schnittdicke von 220 nm) kritisch. Über die ermittelten Schnittdicken ist in Kapitel 4.9 nachzulesen.

So ist bei sehr dünnen Schnitten im Bereich 100 nm im hydratisierten Zustand zu beachten, dass Eiskristalle im Bereich der Schnittdicke auftreten können und beim Gefriertrocknen die Struktur zerstören und Konzentrationsverschiebungen hervorrufen können (Zierold, 1984). Weiterhin ist bei diesen Schnittdicken zu beachten, dass nach der Gefriertrocknung die Dicke des Cytosols mit einem Wassergehalt von rund 75% nur noch ein Viertel der Schnittdicke

ausmacht und damit in den Bereich der Dicke des Films von etwa 30 nm kommt. In diesem Bereich ist somit der Einfluss der Korrekturen des Kontinuums und die damit verbundenen Fehlermöglichkeiten (siehe Kapitel 3.4.1) besonders hoch. Bei den Messungen an Mitochondrien ist dies auf Grund des wesentlich geringeren Wassergehaltes eher selten der Fall.

Wird mit einer festen Messzeit gearbeitet, kommt es bei sehr dünnen Schnitten auf Grund des geringen Messvolumens außerdem zu einer sehr geringen Zählrate und damit zu einer schlechten Zählstatistik.

Aber auch bei dickeren Schnitten kann es zu Problemen kommen. Hier ist darauf zu achten, dass es nicht zu einem Überlappen von Kompartimenten in Strahlrichtung kommt. Dabei kann man das Problem bei den Messungen am Cytosol ausschließen, da die Mitochondrien nach der Gefriertrocknung wesentlich elektronendichter sind und auf Grund ihrer geometrischen Form einen deutlichen Kontrast geben. Bei den Mitochondrien kann man allerdings eine Überlappung mit Teilen des Cytosols rein optisch kaum ausschließen. Der Anteil kann aber kleingehalten werden, indem man immer die Mitochondrien mit dem stärksten Kontrast im elektronenoptischen Bild zum Messen verwendet.

Zur Reduzierung der durch oben beschriebene Einflüsse verursachten Streuung in den einzelnen Gruppen wurden folgende Auswahlkriterien festgelegt:

Es werden nur Messungen berücksichtigt, bei denen das Kontinuum und damit die Massendicke mindestens doppelt so groß ist wie die Summe der Kontinuumanteile aus Film und Gridkorrektur. Damit wird der Anteil der Kontinuumkorrektur auf 33% eingeschränkt und der dadurch verursachte Fehler auf maximal 10% beschränkt. Zusätzlich werden dadurch extrem dünne Schnitte mit der Möglichkeit der im Verhältnis zu großen Eiskristalle eliminiert.

Es werden bei den Messungen an Mitochondrien diejenigen nicht berücksichtigt, die im Vergleich zum Mittelwert deutlich mehr Kalium und wesentlich weniger Phosphor aufweisen. Dabei wird als Grenze jeweils der einfache Wert der Standardabweichung verwendet ( $70 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  für Kalium und  $65 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  für Phosphor). Dieses Kriterium wurde gewählt, da Mitochondrien mit etwa  $350 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  im Vergleich zum Cytosol mit etwa  $700 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  eine wesentlich niedrigere Kaliumkonzentration und mit etwa  $450 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  im Vergleich zum Cytosol mit etwa  $260 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  eine wesentlich höhere Phosphorkonzentration besitzen. Ein deutliches Abweichen der Phosphorkonzentration nach unten und der Kaliumkonzentration zu höheren Werten kann daher als Überlagerung der Kompartimente gedeutet werden.

	WKY $\pm$ SD	N	SHR $\pm$ SD	N	Diff.	t-Wert	P
Mito alle.	0.33 $\pm$ 1.11	254	0.57 $\pm$ 1.00	243	-0.24	2.53	0.012
Mito doü	1.90 $\pm$ 3.07	4	1.03 $\pm$ 0.25	2	0.87	0.38	0.725
Mito korr	0.30 $\pm$ 1.05	250	0.56 $\pm$ 1.00	241	-0.26	2.81	0.005
Cytosol alle	2.75 $\pm$ 1.84	226	2.96 $\pm$ 2.16	223	-0.27	1.43	0.154
Cytosol doür	3.92 $\pm$ 2.84	24	2.87 $\pm$ 2.77	29	1.05	1.36	0.180
Cytosol korr	2.54 $\pm$ 1.64	202	2.98 $\pm$ 2.06	194	-0.44	2.36	0.019

**Tab. 6-8**

Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in  $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$  berechnet für alle Messungen (alle), die nach Korrekturen aus Kapitel 6.3 noch verwendet wurden, für Messungen, die Schnittdickeneinfluss unterlagen (doü) und die Messungen nach Eliminierung der beeinflussten Messungen (korr)

In Tabelle 6-8 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Messungen ohne Berücksichtigung der Schnittdickeneinflüsse (alle) mit denen, die eines der oben aufgeführten Kriterien erfüllen (doü, zu dünn oder überlagert) und der korrigierten Population ohne aussortierte Messungen (korr) verglichen.

Im Bereich der Mitochondrien konnten nur wenige Messungen gefunden werden, die für eine Beeinflussung der Konzentrationen durch die Schnittdicke, die deutlich über statistische Fluktuationen hinausgehen, sprechen. Die Elimination dieser wenigen Messungen führt aber im Bereich der Messungen an WKY-Ratten zu einer Verringerung der Standardabweichung und im Vergleich der Calciumkonzentrationen von WKY und SHR-Ratten zu einem signifikanten Unterschied auf einem Signifikanzniveau von  $< 0.01$ .

Bei den Messungen am Cytosol unterlagen etwa 10 % dem Auswahlkriterium hinsichtlich der Kontinuumkorrektur. Diese Messungen zeigen große statistische Schwankungen und ein uneinheitliches Bild hinsichtlich der Calciumkonzentration. Hinsichtlich der Kaliumkonzentration weisen sie mit etwa  $800 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  sowohl für SHR als auch für WKY-Ratten einen deutlich höheren Wert auf, was auf Probleme mit der Größe der Eiskristalle im Verhältnis zur Schnittdicke zurückführbar sein könnte.

Die Elimination diese Messungen führt zu einer deutlichen Reduzierung der Streuung der Verteilungen der Calciumkonzentrationen und zu einem signifikanten Unterschied in der Calciumkonzentration von Messungen am Cytosol bei SHR und WKY-Ratten auf einem Signifikanzniveau von  $< 0.02$ .

## 6.5 Einfluss der Zählrate

Ausgehend von den in Tabelle 6-8 mit „korr“ bezeichneten Messungen soll im Folgenden der Einfluss der Zählrate entsprechend Kapitel 5.8 untersucht werden. Wie dort dargestellt, ist das unsere Messungen betreffende Problem der Summenpeak von Kalium- $K\alpha$ -Strahlung und Kohlenstoff-Strahlung. Dieser ist proportional zur Zählrate von Kohlenstoff und Kalium. Da die Kaliumkonzentration und die Kohlenstoffkonzentration in den jeweiligen Kompartimenten annähernd konstant sind, ist die Größe der Zählrate näherungsweise nur noch von Schnittdicke und Strahlstrom abhängig. Da die eigentliche Zählrate von Kohlenstoff und Kalium durch den sich im Summenpeak äußernden Verlust an Quanten beeinflusst ist, muss eine andere Bezugsgröße gewählt werden.

Eine Größe, die der Messung gut zugänglich ist und die gleiche Abhängigkeit von Schnittdicke und Strahlstrom zeigt, ist die Totzeit.

Das zur Berechnung der Konzentrationen verwendete Kaliumprofil wurde aus Standards erstellt, die nachträglich mit Kohle beschichtet wurden, um ein ähnliches Verhältnis zwischen Kohlenstoff und Kalium zu erhalten wie in den biologischen Präparaten. Einen Vergleich der die Größe des Summenpeaks beeinflussenden Größen für Messungen an Kaliumprofil, SHR- und WKY-Ratten zeigt Tabelle 6-9.

Ausgehend von der Totzeit wurden aus allen nach den vorherigen Kapiteln korrigierten Messungen Gruppen gebildet. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Zählraten von Mitochondrien und Cytosol bei gleichem Strahlstrom durch die unterschiedliche Massendicke nach der Gefriertrocknung stark voneinander abweichen und deshalb unterschiedliche Klassen für die Kompartimente gebildet. Die mittlere Klasse der Mitochondrien wurde dabei an die mittlere Totzeit und diejenige des Kaliumprofils angelehnt.

	Totzeit $\pm$ SD	Zählrate C $\pm$ SD	N
Profil	20 $\pm$ 0	319 $\pm$ 0	1
Mito WKY	22 $\pm$ 6	377 $\pm$ 133	262
Mito SHR	18 $\pm$ 6	306 $\pm$ 112	249
Cyto WKY	13 $\pm$ 3	163 $\pm$ 58	241
Cyto SHR	10 $\pm$ 3	128 $\pm$ 45	229

**Tab. 6-9** Vergleich der Totzeit in % und der Zählrate von Kohlenstoff in Counts (Impulsen) pro Sekunde (cps) der für die Erstellung des Kaliumprofils verwendeten Messung mit den Mittelwerten dieser Größen für Messungen an Mitochondrien (Mito) und am Cytosol (Cyto) von WKY- und SHR-Ratten

Tabelle 6-10 zeigt einen Vergleich zwischen den Mittelwerten und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Totzeit (mit den jeweiligen Prozentintervallen als Bezeichnung) und dem Mittelwert für alle Messungen (alle).

	WKY $\pm$ SD	N	SHR $\pm$ SD	N	Diff.	t-Wert	P
Mito alle.	0.30 $\pm$ 1.05	250	0.56 $\pm$ 1.00	241	-0.26	2.81	0.005
Mito <15%	0.84 $\pm$ 1.09	29	0.85 $\pm$ 1.22	70	-0.01	0.04	0.970
Mito 15-25%	0.44 $\pm$ 1.02	142	0.50 $\pm$ 0.87	153	-0.06	0.54	0.586
Mito >25%	-0.13 $\pm$ 0.94	79	-0.01 $\pm$ 0.84	18	-0.12	0.50	0.620
Cyto alle	2.54 $\pm$ 1.64	202	2.98 $\pm$ 2.06	194	-0.44	2.36	0.019
Cyto <10%	3.10 $\pm$ 1.77	30	3.60 $\pm$ 2.41	82	-0.50	1.04	0.302
Cyto 10-20%	2.67 $\pm$ 1.69	120	2.58 $\pm$ 1.68	91	0.09	0.38	0.701
Cyto >20%	1.93 $\pm$ 1.21	52	2.24 $\pm$ 1.33	21	-0.31	0.96	0.339

**Tab. 6-10** Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> berechnet für alle Messungen (alle) und verschiedene nach der Totzeit ausgewählte Bereiche

Wie schon aus Tabelle 6-9 zu entnehmen ist, existiert ein merklicher Unterschied in den mittleren Totzeiten der Messungen an Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten. Da die allgemeinen Messeinstellungen wie Messzeit, Strahldurchmesser und Filamentheizung unverändert gelassen wurden, hängt dieser Unterschied wahrscheinlich mit der Abhängigkeit der Elektronenausbeute von der Lebenszeit der LaB<sub>6</sub>-Kathode zusammen.

Vergleicht man nun in Tabelle 6-10 die nach der Totzeit sortierten Untergruppen, fallen alle in der Gesamtpopulation bestehenden signifikanten Unterschiede weg. Der hauptsächliche Unterschied in den Calciumkonzentrationen von WKY- und SHR-Ratten ist also durch die Differenz in der Totzeit (wahrscheinlich hervorgerufen durch unterschiedlichen Strahlstrom) bedingt. Diese Differenz führt zu einem unterschiedlichen Einfluss in der Wirkung des systematischen Fehlers Zählratenabhängigkeit (Summenpeak Kalium-Kohlenstoff). Wählt man dagegen Gruppen mit vergleichbarer Totzeit und damit vergleichbarem systematischen Fehler, ergibt sich kein signifikanter Unterschied mehr.

Die Reduktion der Standardabweichung mit erhöhter Totzeit ist auf die Reduzierung des Streuungsanteiles der statistischen Komponente zurückzuführen, da bei gleicher Messzeit mit



erhöhter Zählrate absolut mehr Counts gesammelt werden.

Zur Betrachtung der absoluten Konzentrationen und weiteren Analyse sollten nur Gruppen mit einer mittleren Totzeit von 20% und einer Zählrate für Kohlenstoff von etwa 320 cps verwendet werden. Diese stimmen mit den Bedingungen zur Bestimmung des Kaliumprofils am besten überein, und der systematische Fehler kann hier annähernd eliminiert werden.

## 6.6 Einfluss physiologischer Parameter

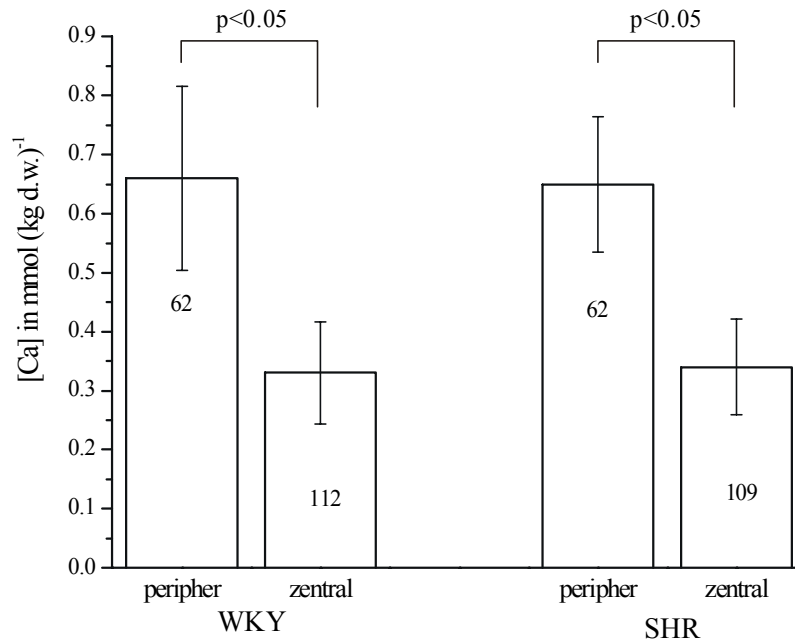
Gallitelli et.al. (Gallitelli *et al.*, 1999) zeigten an Messungen am Meerschwein, dass man aus physiologischer Sicht die Mitochondrien innerhalb der Zelle hinsichtlich ihres Calciumspeicherungsverhaltens in zwei Populationen einteilen kann. Dabei unterscheiden sich die in der Nähe der Zellmembran (mit peripher bezeichnet) befindlichen Mitochondrien hinsichtlich der Elementverteilungen von denen, die mehr im Zellinneren (mit zentral bezeichnet) lokalisiert sind. Unterscheidet man also die nach Kapitel 6.5 hinsichtlich der Totzeit und der Zählrate für Kohlenstoff egalisierten Messungen nach der Lokalisation der Mitochondrien, ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen:

	WKY $\pm$ SD	N	SHR $\pm$ SD	N	Diff.	t-Wert	P
Mito peripher	0.66 $\pm$ 1.23	62	0.65 $\pm$ 0.90	62	0.01	0.05	0.959
Mito zentral	0.33 $\pm$ 0.91	112	0.34 $\pm$ 0.85	109	-0.01	0.08	0.933

**Tab. 6-11** Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle

Für die Berechnung der Werte in Tabelle 6-11 wurden alle Messungen im Bereich der einfachen Streuung um den Mittelwert der Totzeit von 20% (20 $\pm$ 6%) ausgewählt, so dass weitere Einflüsse durch zählratenabhängige systematische Fehler ausgeschlossen werden konnten. Die mittlere Totzeit für alle Gruppen in Tabelle 6-11 beträgt also 20%, die mittleren Zählraten für Kohlenstoff liegen zwischen 312 und 324 cps.

Wie bei den oben erwähnten Messungen am Meerschwein gibt es auch bei der Ratte innerhalb einer Gruppe signifikante Unterschiede hinsichtlich der Calciumkonzentration in den Mitochondrien, wenn man die Lokalisation berücksichtigt. So ist der Mittelwert der Calciumkonzentration bei peripheren und zentralen Mitochondrien trotz der verringerten Anzahl der Messungen für die WKY Ratten mit p=0.046 und für die SHR Ratten mit p=0.026 auf dem Signifikanzniveau von 0.05 signifikant unterschiedlich. Dies ist noch einmal in Abbildung 6-3 verdeutlicht.



**Abb. 6-3** Vergleich zwischen den Mittelwerten der Calciumkonzentrationen in Mitochondrien von SHR- und WKY-Ratten in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle. Zusätzlich angegeben sind signifikante Unterschiede mit Signifikanzniveau ( $p < 0.05$ ). Die Fehlerbalken stellen den Fehler des Mittelwertes (SEM) dar. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der jeweiligen Messungen an.

Diese Unterschiede werden erst durch die Berücksichtigung und Korrektur der in den Kapiteln 6.2 bis 6.5 beschriebenen Einflüsse deutlich. Das zeigt der in Tabelle 6-12 dargestellte Vergleich der nach Lokalisation getrennten Daten der Calciumkonzentrationen vor (alle) und nach (korr) Berücksichtigung der Fehlereinflüsse.

	peripher	N	zentral	N	Diff.	t-Wert	P
WKY alle	0.36 ± 1.19	100	0.38 ± 1.16	162	-0.02	0.13	0.893
WKY korr	0.66 ± 1.23	62	0.33 ± 0.91	112	0.33	1.01	0.046
SHR alle	0.76 ± 0.96	92	0.47 ± 1.01	157	0.29	2.23	0.027
SHR korr	0.65 ± 0.90	62	0.34 ± 0.85	109	0.31	2.24	0.026

**Tab. 6-12** Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien in mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Zelle vor und nach Berücksichtigung von Korrekturen. Die Daten wurden dabei nach Gruppe der Tiere (WKY- und SHR-Ratten) getrennt.

Berücksichtigt man noch die Lokalisation beim Vergleich von WKY- und SHR-Ratten, gibt es allerdings keinerlei Unterschiede mehr zwischen den Calciumkonzentrationen (Tabelle 6-11). Dies ist nicht auf die reduzierte Anzahl der Messungen, sondern auf die Angleichung der Mittelwerte zurückzuführen. Diese Ergebnisse stimmen gut mit denen von (Moravec *et al.*, 1995) aus Messungen an 26 Wochen alten SHR-Ratten überein. Hier betragen die ermittelten Calciumkonzentrationen  $0.7 \pm 0.2$  mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> (Mittelwert ± SEM für 47 Messun-

gen) für Mitochondrien von SHR-Ratten und  $0.6 \pm 0.2 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM für 52 Messungen) für Mitochondrien von WKY-Ratten. Die gegenüber unseren Messungen leicht erhöhten Calciumkonzentrationen in den gefriergetrockneten Präparaten können durch die in Kapitel 4.9 beschriebene Abhängigkeit der massendicke und damit des Wassergehaltes der Mitochondrien vom Alter der Tiere bedingt sein.

Die von uns untersuchten SHR Ratten mit ihrem Alter von 15 Monaten wiesen noch eine vollständige Kompensation des Bluthochdruckes auf, da sie weder Stauungszeichen in der Leber noch in der Lunge zeigten. Die Ratten waren also noch nicht im Bereich einer Herzinsuffizienz und damit noch in der Lage die Versorgung der Organe mit Blut vollständig zu gewährleisten. Bei noch älteren Ratten kann sich dies durchaus ändern, so dass die Versorgung auch der Herzmuskelzellen über die Koronargefäße nicht mehr ausreichend gesichert ist. Betrachtet man die Standardabweichungen für zentrale Mitochondrien aus Tabelle 6-11, so sind diese am kleinsten und damit die zentralen Mitochondrien die jeweils homogenste Gruppe. Die größeren Standardabweichungen für die Calciumkonzentrationen der peripheren Mitochondrien sprechen für lokale Konzentrationsschwankungen in Membrannähe (Wendt-Gallitelli *et al.*, 1993).

Mit einer Verteilungsbreite von 0.91 (WKY) bzw.  $0.85 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  (SHR) liegen die Werte für die zentralen Mitochondrien in der Nähe des in Abb. 5-6 berechneten theoretischen Wertes für rein statistischen Schwankungen von  $0.72 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ . Das heißt, für diese Gruppe von Mitochondrien ist die von vielen Arbeitsgruppen zur Erklärung von starken Schwankungen herangezogene biologische Variabilität sehr klein. Die Schwankungen sind also eher auf die in den obigen Teilkapiteln beschriebenen systematischen Fehler (Überlagerung, Zählratenabhängigkeit, Kontinuumkorrektur), ungenügende Messzeiten zur Verbesserung der Statistik und die Nichtbeachtung der Lokalisation zurückzuführen.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Ergebnisse der quantitativen Elektronenstrahlmikroanalyse biologischer Proben zu charakterisieren. Viele Probleme sind als solche aus der Literatur bekannt und wurden in ihrer Bedeutung für die von uns verwendeten Messsysteme und Präparate genauer untersucht. Dazu gehören zum Beispiel der Masseverlust bei Standards und biologischen Proben, die Abhängigkeit von der Probenorientierung und spezielle Zählrateneffekte. Andere Einflüsse wurden in dieser Form erstmalig analysiert, wie die Siliziumkontamination, die Abhängigkeit der berechneten Calciumkonzentration von der Kaliumkonzentration im Präparat und vom Top-Hat-Filter und der Einfluss der Bestimmung der Kaliumprofile auf die Berechnung der Calciumkonzentration. Erstmals wurde eine Aufspaltung der Fehlerursachen durch verschiedenste Simulationsrechnungen und Standard- sowie Präparatmessungen durchgeführt, um Informationen über die biologischen Variabilität zwischen den einzelnen untersuchten Zellen zu erhalten. Dazu wurde die Auswerte- und Simulationssoftware selbst erstellt.

Es wurden Verbesserungsvorschläge sowohl für einzelne präparative Schritte als auch für Teile der quantitativen Auswertung der Spektren angeboten:

- 1) Die Kaliumprofile müssen aus dünnen Kristallstrukturen gewonnen werden, um Absorptionseffekte zu vermeiden. Die Zählraten für Kalium und Kohlenstoff müssen für die Messungen zur Profilerstellung und die Messungen an biologischen Proben annähernd identisch sein. Anderenfalls kommt es durch den MLSQ-Fit auf Grund von Absorptionskanten und Impulsaufstockung zu verfälschten Calciumkonzentrationen.
- 2) Die Kontamination durch Silizium entsteht bei der Präparation der Filme mittels Parafilmpapier. Eine mathematische Korrektur für Messungen mit Siliziumkontamination wurde in die Berechnungen einbezogen. Es ergibt sich außer der Korrektur des einzelnen Konzentrationswertes zum Beispiel für die Bestimmung der Kaliumkonzentration in Mitochondrien von Ventrikelmyozyten der Ratte eine Verringerung der Streuung von 25 % auf 20 %.
- 3) Es existiert ein optimaler Top-Hat-Filter zur Bestimmung der Calciumkonzentration bei hohen Kaliumkonzentrationen mittels gefilterten MLSQ-Fit. Dieser hat bei der Auflösung des von uns verwendeten Detektors (FWHM von 120 eV bei  $Mn_{K\alpha}$ ) die Dimension  $m=13$ ,  $n=5$ .
- 4) Die Berücksichtigung von im elektronenmikroskopischen Bild nicht sichtbaren Überlagerungen durch Teile der die Zelle umgebenden Lösung oder andere Kompartimente mit Hilfe von Auswahlkriterien aus einer Überlagerungstabelle reduziert die Streuung bei der Bestimmung der Calciumkonzentration. Für Mitochondrien in Ventrikelmyozyten der Ratte ergibt sich eine Reduktion der Streuung bis zu 10 % und eine Korrektur der Mittelwerte.
- 5) Die Berücksichtigung von Zählrateneffekten reduziert die Streuung bei den unter 4) verwendeten Messungen weiter um bis zu 13 % und korrigiert ebenfalls die Mittelwerte. Eine bessere Möglichkeit ist allerdings, die Zählraten während der Messungen durch Variation von Strom und Strahldurchmesser so konstant wie möglich zu halten.
- 6) Die Berechnung der Ordnungszahlkorrektur  $Z^2/A$  ist nicht notwendigerweise iterativ durchzuführen, sondern kann direkt erfolgen.
- 7) Ein Vorschlag zur Reduzierung der statistisch bedingten Streuung im MLSQ-Fit durch Verwendung einer Kovarianzmatrix als Wichtungsmatrix wurde mathematisch abgeleitet. Weiterhin wurden die Versuchsbedingungen hinsichtlich Messzeit und Strahlstrom optimiert,

um den Masseverlust klein zu halten und trotzdem eine gute Zählstatistik zu erreichen. Es wurde die Massendicke der Proben bestimmt, um die berechneten Konzentrationen vergleichen zu können.

Nach Berücksichtigung aller in dieser Arbeit untersuchten Einflüsse auf die quantitative Bestimmung der Calciumkonzentration in Mitochondrien von isolierten Ventrikelmyozyten der Ratte (ein spezielles Beispiel für die Anwendung der Methode) zeigt sich, dass die Streuung der Messwerteverteilung nur noch wenig von der statistisch bedingten Streuung abweicht. So ergibt sich für zentral gelegene Mitochondrien bei Messungen an 16 Zellen von 7 Tieren des Stammes Whistar Kyoto (WKY-Ratten, gesunde Kontrolltiere) eine Calciumkonzentration von  $0.33 \pm 0.91 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  (112 Spektren) und für zentral gelegene Mitochondrien bei Messungen an 19 Zellen von 8 Tieren mit Bluthochdruck und Herzhypertrophie (SHR-Ratten) eine Calciumkonzentration von  $0.34 \pm 0.85 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  (109 Spektren). Hier sind die angegebenen Standardabweichungen unwesentlich größer als die Standardabweichung von  $0.72 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ , die aus Simulationsrechnungen für rein statistische Schwankungen kleiner Calciumkonzentrationen bei großen Kaliumkonzentrationen berechnet wurde. Das bedeutet, dass trotz der oben angegebenen größeren Zahl von untersuchten Tieren und Zellen die biologische Variabilität für diese Gruppe von Mitochondrien relativ klein ist.

Hinsichtlich der Calciumkonzentration konnten nach Berücksichtigung aller untersuchten Einflüsse keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den spontan Bluthochdruck entwickelnden Ratten nachgewiesen werden. Das heißt, in diesem Stadium der Herzhypertrophie sind in den Mitochondrien noch keine Zeichen einer gestörten Calciumhomöostase nachweisbar. Diese wurden in der Literatur immer wieder als Vorboten der später auftretenden Herzinsuffizienz postuliert, jedoch nie experimentell belegt.

Es ergeben sich auch keine Unterschiede zwischen den Calciumkonzentrationen der beiden Gruppen WKY und SHR, wenn man die peripheren, also in Membrannähe lokalisierten, Mitochondrien betrachtet. Hier wurden Calciumkonzentrationen von  $0.66 \pm 1.23 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  (62 Spektren) für die WKY-Ratten und  $0.65 \pm 0.90 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  (62 Spektren) für die SHR-Ratten bestimmt. Die gegenüber den zentralen Mitochondrien größeren Verteilungsbreiten ergeben sich wahrscheinlich durch die in Membrannähe vorhandenen Inhomogenitäten in den Ionenverteilungen (Wendt-Gallitelli *et al.*, 1993). Diese submembranären Mikrodomänen mit besonderen Ionenkonzentrationen sind durch den Ionenfluss durch die Zellmembran bedingt.

Der Unterschied der Calciumkonzentration zwischen den zentralen und peripheren Mitochondrien ist allerdings für die jeweilige Gruppe von Ratten signifikant auf einem Signifikanzniveau von 0.05. Dies lässt in Einklang mit Befunden am Meerschwein (Gallitelli *et al.*, 1999) den Schluss zu, dass die beiden Mitochondrienpopulationen unterschiedlich an der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration beteiligt sind. Dieser von anderen Arbeitsgruppen (Horikawa *et al.*, 1998) übersehene Unterschied kann mittels EPMA allerdings nur bei sorgfältiger Auswahl der Messpunkte und Berücksichtigung bzw. Vermeidung möglicher Fehlereinflüsse nachgewiesen werden. So wurden erstmals von Gallitelli *et al.* bei Untersuchungen mittels EPMA Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation der Mitochondrien in der Zelle berücksichtigt. Durch die hier vorliegende Arbeit wurde eine zellrandständige Populati-

on von Mitochondrien nun auch in der Ratte nachgewiesen, die durch ihre Nähe zur Zellmembran und damit zu submembranären Mikrodomänen höherer Calciumkonzentration, eine höhere Calciumbeladung als die zentral gelegenen Mitochondrien aufweist. Da das mitochondriale Calcium als wichtiger Modulator der Energieproduktion der Zelle angesehen wird, kann man randständigen Mitochondrien eine besondere Bedeutung bei der schnellen calciumabhängigen Anpassung der Energieversorgung an den Energiebedarf der arbeitenden Myokardzelle zuschreiben.

Die in der Arbeit von (Horikawa *et al.*, 1998) angegebene Calciumkonzentration von  $0.5 \pm 0.34 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM für 3 Messungen an je 2 Zellen von 5 Tieren) weist eine Streuung von  $\sigma = 0.34 * \sqrt{30} = 1.87 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$  auf. Diese liegt deutlich über den in dieser Arbeit angegebenen Verteilungsbreiten unserer Messungen. Die Ursache dafür kann in physiologischen Parametern (Lokalisation, Zellzustand), aber auch in den gewählten Messbedingungen liegen. Leider ist der Vergleich mit anderen Arbeiten zur EPMA an biologischen Präparaten oft durch unzureichende Angaben über Messbedingungen wie Strahlstrom, Messzeit, Messbereichsgröße und über Korrekturverfahren bei der quantitativen Analyse erschwert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde deutlich gezeigt, welche Rolle die Berücksichtigung von statistischen, systematischen und präparativen Fehlermöglichkeiten auf die quantitative Auswertung der Spektren bis hin zur Konzentrationsbestimmung spielt. So wird es möglich, die Schwankungen der Messwerte klein zu halten und somit geringe Unterschiede in den Mittelwerten statistisch gesichert zu erkennen oder nicht vorhandene Unterschiede als methodisch gesichert zu betrachten. Es zeigt sich: trotz vieler Fehlermöglichkeiten und Probleme bei der Probenpräparation, bei der Aufnahme und der Auswertung der Spektren, sind Aussagen zu funktionsabhängigen Veränderungen bei Elementkonzentrationen in der Nähe der Auflösungsgrenze der Methode möglich.

Fragt man sich zum Schluss, ob alle Möglichkeiten zur Verbesserung der Methode ausgeschöpft wurden, so könnten für zukünftige Studien noch folgende Vorschläge berücksichtigt werden:

- 1) Eine weitere Reduzierung der Streuung ist vor allem in Hinblick auf die Untersuchung zeitabhängiger Veränderungen der Elementkonzentrationen interessant. Da man infolge des Einfrierens bei jeder Zelle nur einen Messzeitpunkt des Kontraktionszyklus analysieren kann, hat man relativ wenig Messungen pro Zeitpunkt zur Verfügung. Damit ist es für den Nachweis eines signifikanten Unterschiedes notwendig, die Streuung klein zu halten (siehe Kapitel 3.7). Wie in der Arbeit gezeigt wurde, war bei sorgfältigem Arbeiten der Hauptteil der Streuung der Messwerte nur noch durch die Zählstatistik bedingt. Hier kann man in einem gewissen Bereich die Messzeiten verlängern, mindestens solange, wie die in die Probe eingebrachte Elektronendosis keinen merklichen Masseverlust verursacht.
- 2) Zur Verbesserung der Zählstatistik könnten sogenannte „large solid angle“ Detektoren, wie sie in (Watanabe *et al.*, 1999) beschrieben sind, verwendet werden. Damit soll sich die Effizienz der Detektion der in der Probe entstehenden Röntgenstrahlung im Vergleich zu dem von uns verwendeten Detektor um das 3-fache erhöhen. Der Austrittswinkel in Richtung Detektor und die damit verbundene Absorption in der Probe sollten allerdings berücksichtigt werden.
- 3) Weiterhin kann versucht werden, die Auswirkungen der statistischen Schwankungen auf

die quantitative Auswertung der Spektren zu reduzieren. Dies ließe sich zum Beispiel unter Verwendung der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Kovarianzmatrix als Wichtungsmatrix für den MLSQ-Fit realisieren. Die verwendete Wichtungsmatrix kann statistisch noch weiter entwickelt werden, wenn man die Werte in den einzelnen Kanälen durch die Faltung mit der Detektorfunktion nicht mehr als voneinander unabhängige Zufallsgrößen betrachtet.

4) Weiterhin wurde in der Arbeit verdeutlicht, dass die Dimension des Top-Hat-Filters die Streuung beeinflusst. Dabei ist die optimale Dimension von der Energie und dem Abstand sich überlappender Peaks abhängig. In Anlehnung an (Laquerriere *et al.*, 2001) sollte der Top-Hat-Filter in seiner Dimension über den gesamten Energiebereich variiert werden.

5) Schließlich sollte für Vergleiche von physiologischen Elementkonzentrationen unterschiedlicher Kompartimente einer Zelle der Wassergehalt ermittelt werden. Ebenso ist diese Kenntnis für altersabhängige Konzentrationsvergleiche notwendig, was durch die in der Arbeit gezeigte Abhängigkeit des Wassergehalts vom Alter der Tiere verdeutlicht wurde. Da das Hauptproblem bei der Bestimmung des Wassergehaltes, wie in der Arbeit gezeigt, in der Bestimmung der variierenden Schnittdicke besteht, müsste eine Methode zur Bestimmung der Schnittdicke am Einzelschnitt im Elektronenmikroskop etabliert werden. Denkbar wäre zum Beispiel ein Tomographieverfahren mit geeignetem Halter, der eine Kippung über einen weiten Winkelbereich bei gleichzeitiger Probenkühlung zulässt. Hierzu ist für eine entsprechende Genauigkeit im Nanometerbereich ein hochauflösendes Elektronenmikroskop nötig.

---

**Literatur**

Brümmer, O. (1977). *Mikroanalyse mit Elektronen- und Ionensonden*. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.

Chandler, J. A. (1976). A method for preparing absolute standards for quantitative calibration and measurement of section thickness with X-ray microanalysis of biological ultrathin specimens in EMMA. *Journal of Microscopy* 106, 291-302.

Cliff, G. & Lorimer, G. W. (1975). The quantitative analysis of thin specimens. *Journal of Microscopy* 103, 203-207.

Cobet, U. & Uhlmann, W. (1973). Zur statistischen Auswertung von Messwerten bei der Elektronenstrahlmikroanalyse. *Experimentelle Technik der Physik XXI*, 113-124.

Doggrell, S. A. & Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research* 39, 89-105.

Echlin, P. (1991). Ice crystal damage and radiation effects in relation to microscopy and analysis at low temperatures. *Journal of Microscopy* 161, 159-170.

Fiori, C. E., Myklebust, R. L., & Newbury, D. E. A (1979). Catalogue of artifacts observed in energy-dispersive X-Ray spectrometry and their influence on analysis. In *Microbeam Analysis in Biology* eds. Lechene, C. P. & Warner, R. R., 225-260. Academic Press, New York.

Fiori, C. E. & Newbury, D. E. (1980). Artifacts in energy dispersive X-Ray spectrometry in the scanning electron microscope (II). *Scanning Electron Microscopy* 251-258.

Frederik, P. M. (1982). Cryoultramicrotomy - Recognition of artifacts. *Scanning Electron Microscopy*, 709-721.

Gallitelli, M. F., Schultz, M., Isenberg, G., & Rudolf, F. (1999). Twitch-potential increases calcium in peripheral more than in central mitochondria of guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology-London* 518, 433-447.

Gnedenko, B. W. (1968). *Lehrbuch der Wahrscheinlichkeitsrechnung*. Akademie-Verlag, Berlin.

Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., & Gunter, K. K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28, 285-296.

Gunter, T. E. & Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *American Journal of Physiology* 258, C755-C786.

Gupta, B. L. & Hall, T. A. (1978). Electron microprobe X-Ray analysis of calcium. *Annals of the New York Academy of Sciences* 307, 28-51.

Hall, T. A. (1979a). Biological X-ray microanalysis. *Journal of Microscopy* 117, 145-163.



- Hall, T. A. (1979b). Problems of the Continuum-Normalization Method for the Quantitative Analysis of Sections of Soft Tissue. In *Microbeam Analysis in Biology*, eds. Lechene, C. P. & Warner, R. R., 185-208. Academic Press, New York.
- Hall, T. A., Anderson, H. C., & Appleton, T. (1973). The use of thin specimens for X-ray microanalysis in biology. *Journal of Microscopy* 99, 177-182.
- Hall, T. A. & Gupta, B. L. (1982). Quantification for the X-ray microanalysis of cryosections. *Journal of Microscopy* 126, 333-345.
- Han, S., Schiefer, A., & Isenberg, G. (1994).  $\text{Ca}^{2+}$  load of guinea-pig ventricular myocytes determines efficacy of brief  $\text{Ca}^{2+}$  currents as trigger for  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Journal of Physiology* 480, 411-421.
- Horikawa, Y., Goel, A., Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1998). Mitochondrial calcium in relaxed and tetanized myocardium. *Biophysical Journal* 74, 1579-1590.
- Isenberg, G., Han, S., Schiefer, A., & Wendt-Gallitelli, M. F. (1993). Changes in mitochondrial calcium concentration during the cardiac contraction cycle. *Cardiovascular Research* 27, 1800-1809.
- Isenberg, G. & Klöckner, U. (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB Medium". *Pflügers Archiv* 395, 6-18.
- Jarosewich, E., Nelen, J. A., & Norberg, J. A. (1979). Electron Microprobe Reference Samples for Mineral Analyses. *Smithsonian Contributions to the Earth Sciences* 22, 68-72.
- Jorgensen, A. O., Broderick, R., Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1988). Two structurally distinct calcium storage sites in rat cardiac sarcoplasmic reticulum: an electron microprobe analysis study. *Circulation Research* 63, 1060-1069.
- Keller, E., Bond, M., & Moravec, C. S. (1997). Progression of left ventricular hypertrophy does not change the sarcoplasmic reticulum calcium store in the spontaneously hypertensive rat heart. *Journal of Molecular and Cell Cardiology* 29, 461-469.
- Kitazawa, T., Shuman, H., & Somlyo, A. P. (1983). Quantitative electron probe analysis: Problems and solutions. *Ultramicroscopy* 11, 251-262.
- Kramers, H. A. (1923). On the Theory of x-ray absorption and of the continuous x-ray spectrum. *Philosophical Magazine* 46, 836-871.
- Lamvik, M. K. (1991). Radiation damage in dry and frozen hydrated organic material. *Journal of Microscopy* 161, 171-181.
- Laquerriere, P., Banchet, V., Michel, J., Zierold, K., Balossier, G., & Bonhomme, P. (2001). X-ray microanalysis of organic thin sections in TEM using an UTW Si(Li) detector: Comparison of quantification methods. *Microscopy Research and Technique* 52, 231-238.
- Lifshin, E., Doganaksoy, N., Sirois, J., & Gauvin, R. (1998). Statistical considerations in microanalysis by energy-dispersive spectrometry. *Microscopy and Microanalysis* 4, 598-604.

- Loew, L. M., Carrington, W., Tuft, R. A., & Fay, F. S. (1994). Physiological cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients evoke concurrent mitochondrial depolarizations. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 91, 12579-83.
- Love, G., Scott, V. D., Dennis, N. M., & Laurensen, L. (1981). Sources of contamination in electron optical equipment. *Scanning* 4, 32.
- Miller, T. W. & Tormey, J. M. (1993). Calcium displacement by lanthanum in subcellular compartments of rat ventricular myocytes: characterisation by electron probe microanalysis. *Cardiovascular Research* 27, 2106-2112.
- Moravec, C. S. & Bond, M. (1992). Effect of inotropic stimulation on mitochondrial calcium in cardiac muscle. *Journal of Biological Chemistry* 267, 5310-5316.
- Moravec, C. S., Keller, E., & Bond, M. (1995). Decreased inotropic response to beta-adrenergic stimulation and normal sarcoplasmic reticulum calcium stores in the spontaneously hypertensive rat heart. *Journal of Molecular and Cell Cardiology* 27, 2101-2109.
- Polimeni, P. I. (1974). Extracellular space and ionic distribution in rat ventricle. *American Journal of Physiology* 227, 676-683.
- Roomans, G. M. (1981). Quantitative X-Ray microanalysis of thin sections. In *X-Ray Microanalysis in Biology*, ed. Hayat, M. A., 401-453. University Park Press, Baltimore.
- Roomans, G. M. & Barnard, T. (1982). Calcium and magnesium in exocrine secretion - An x-ray microanalytical study. *Scanning Electron Microscopy* 1, 229-242.
- Sachs, L. (1999). *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, Berlin.
- Schamber, F. H. Dzubay, T. (1977). *Proceedings of the Symposium "X-Ray Fluorescence Analysis of Environmental Samples"* Chapel Hill, N.C. 1976, 241-257
- Schultz, M., Rudolf, F., & Gallitelli, M. F. (1999). Improvement in quantitative X-ray microanalysis of biological cryosections. *Microscopy and Microanalysis* 5, 187-196.
- Schultz, M. & Wendt-Gallitelli, M. F. (1998). Improved quantitative electron probe X-ray microanalysis of biological cryosections using an EDS germanium detector and a super-atmosphere thin window (SuperATW). *Journal of Microscopy* 190, 293-297.
- Scott, V. D., Love, G., & Reed, S. J. B. (1995). *Quantitative electron-probe microanalysis*. Ellis Horwood Limited, New York.
- Shi, S., Sun, S., Andrews, S. B., & Leapman, R. D. (1996). Thickness measurement of hydrated and dehydrated cryosections by EELS. *Microscopy Research and Technique*. 33, 241-250.
- Shuman, H., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1976). Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: Methods and validity. *Ultramicroscopy* 1, 317-339.

- Sitte, H. (1996). Advanced instrumentation and methodology related to cryoultramicrotomy: a review. *Scanning Microscopy Supplement* 10, 387-463.
- Somlyo, A. V., Shuman, H., & Somlyo, A. P. (1977a). Composition of sarcoplasmic reticulum in situ by electron probe X-ray microanalysis. *Nature* 268, 556-558.
- Somlyo, A. V., Shuman, H., & Somlyo, A. P. (1977b). Elemental distribution in striated muscle and the effects of hypertonicity. Electron probe analysis of cryosections. *Journal of Cell Biology* 74, 828-857.
- Statham, P. J. (1977). Deconvolution and background subtraction by least-squares fitting with prefiltering of spectra. *Analytical Chemistry* 49, 2149-2154.
- Statham, P. J. (1981). X-ray microanalysis with Si(Li) detectors. *Journal of Microscopy* 123, 1-23.
- Statham, P. J. (1985). Statistics and wishful thinking in microbeam and image analysis. In *Microbeam Analysis-1985*, ed. Armstrong, J. T., 230-234. San Francisco Press, Inc., San Francisco.
- Statham, P. J. (1995). Quantifying Benefits of Resolution and Count Rate in EDX Microanalysis. In *X-Ray Spectrometry in Electron Beam Instruments*, eds. Williams, D., Goldstein, J., & Newbury, D., 101-126. Plenum Press, New York.
- Statham, P. J. (1998). Measuring performance of energy-dispersive X-ray systems. *Microscopy and Microanalysis* 4, 605-615.
- Studer, D. & Gnaegi, H. (2000). Minimal compression of ultrathin sections with use of an oscillating diamond knife. *Journal of Microscopy* 197, 94-100.
- Sun, S. Q., Shi, S. L., Hunt, J. A., & Leapman, R. D. (1995). Quantitative water mapping of cryosectioned cells by electron energy-loss spectroscopy. *Journal of Microscopy* 177, 18-30.
- von Zglinicki, T. (1988). Intracellular water distribution and aging as examined by X-ray microanalysis. *Scanning Microscopy* 2, 1791-804.
- von Zglinicki, T. (1991). The measurement of water distribution in frozen specimens. *Journal of Microscopy* 161, 149-158.
- von Zglinicki, T., Bimmler, M., & Krause, W. (1987). Estimation of organelle water fractions from frozen-dried cryosections. *Journal of Microscopy* 146, 67-75.
- von Zglinicki, T. & Zierold, K. (1989). Elemental concentrations in air-exposed and vacuum-stored cryosections of rat liver cells. *Journal of Microscopy* 154, 227-235.
- Warley, A. (1997). *X-ray microanalysis for biologists*. Portland Press, London.
- Warley, A. & Skepper, J. N. (2000). Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. *Journal of Microscopy* 198, 116-123.

- Watanabe, M., Ackland, D. W., & Williams, D. B. (1999). The effect of large solid angles of collection on quantitative X-ray microanalysis in the AEM. *Journal of Microscopy* 195, 34-43.
- Wendt-Gallitelli, M. F. (1987). Calcium-Gehalt und Funktion intrazellulärer Kompartimente bei der elektro-mechanischen Kopplung des Ventrikel-Myokards. Röntgenmikroanalytische Untersuchungen. *Habilitationsschrift*, Tübingen.
- Wendt-Gallitelli, M. F. & Isenberg, G. (1989). X-ray microanalysis of single cardiac myocytes frozen under voltage-clamp conditions. *American Journal of Physiology* 256, 574-583.
- Wendt-Gallitelli, M. F. & Isenberg, G. (1991). Total and free myoplasmic calcium during a contraction cycle: x-ray microanalysis in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology - London* 435, 349-72.
- Wendt-Gallitelli, M. F., Voigt, T., & Isenberg, G. (1993). Microheterogeneity of subsarcolemmal sodium gradients. Electron probe microanalysis in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology - London* 472, 33-44.
- Wendt-Gallitelli, M. F. & Wolburg, H. (1984). Rapid Freezing, Cryosectioning, and X-ray Microanalysis on Cardiac Muscle Preparations in Defined Functional States. *Journal of Electron Microscopy Technique* 1, 151-174.
- Wheeler-Clark, E. S. & Tormey, J. M. (1987). Electron probe x-ray microanalysis of sarcolemma and junctional sarcoplasmic reticulum in rabbit papillary muscles: low sodium-induced calcium alterations. *Circulation Research* 60, 246.
- Zhou, Z., Matlib, M. A., & Bers, D. M. (1998). Cytosolic and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signals in patch clamped mammalian ventricular myocytes. *Journal of Physiology - London* 507, 379-403.
- Zierold, K. (1984). Experiences in X-ray microanalysis of freeze-dried cryosections. *Scanning Electron Microscopy* 3, 1867-1874.
- Zierold, K. (1986). The determination of wet weight concentrations of elements in freeze-dried cryosections from biological cells. *Scanning Electron Microscopy* 2, 713-24.
- Zierold, K. (1988). X-ray microanalysis of freeze-dried and frozen-hydrated cryosections. *Journal of Electron Microscopy Technique* 9, 65-82.
- Zierold, K. (1991). Cryofixation methods for ion localization in cells by electron probe microanalysis: a review. *Journal of Microscopy* 161, 357-366.
- Zierold, K. (1996). Cryofixation: The bridge between analytical electron microscopy and cell biology. *Microscopy and Analysis*, 11-13.
- Zschornack, G. (1989). *Atomdaten für die Röntgenspektroanalyse*. Springer-Verlag, Berlin.

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1 Mit einem energiedispersiven Germaniumdetektor an einem Philips CM12 Elektronenmikroskop mit 100 kV Anregungsspannung und 3.5 nA Strahlstrom aufgenommenes Röntgenspektrum. Als Probe diente ein 80x80 nm<sup>2</sup> großer Ausschnitt eines Mitochondriums eines Ventrikelmyozyten der Ratte. Die Indizes K $\alpha$  und K $\beta$  sind zur Trennung der Peaks der K $\alpha$ - und K $\beta$ -Linie eines Elementes angegeben. L steht für die L-Linie eines Elementes. Bei Elementbezeichnungen ohne Index handelt es sich immer um die K $\alpha$ -Linie. ....5
- Abb. 1-2 A: Ausschnitt aus dem Spektrum eines mineralischen Standards mit einer Kaliumkonzentration von etwa 1050 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup>. Zu sehen sind der Kalium-K $\alpha$ - und Kalium-K $\beta$ -Peak und die Position des Calcium-K $\alpha$ -Peaks. Die enthaltene Calciumkonzentration beträgt etwa 3 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup>. B: Hier ist der auf das Maximum normierte Kalium-K $\beta$ -Peak (Microline) des Spektrums aus A zusammen mit dem Verlauf des zur Konzentrationsbestimmung verwendeten Profils (Profil2, gestrichelte Linie) dargestellt. Bildet man die Differenz beider Linien, ergibt sich der Calcium-K $\alpha$ -Peak (ebenfalls auf sein Maximum normiert dargestellt, die Intensität im Maximum beträgt etwa 60 Impulse). ....8
- Abb. 2-1 Verlauf von Druck und Temperatur bei der Gefriertrocknung von Kryoschnitten in der Gefriertrockenanlage MED 020. Die Erwärmung erfolgt durch die Raumluft langsam von außen her ohne zusätzliche Heizung. Bei Punkt A Sublimation des am Rezipienten niedergeschlagenen Wassers, bei Punkt B Sublimation des Probenwassers. ....12
- Abb. 2-2 Transmissionselektronenmikroskopisches Bild eines gefriergetrockneten Schnittes eines Ventrikelmyozyten. M-Mitochondrium, K-Kern, Cy-Cytosol, Ty-Tyrode .....12
- Abb. 2-3 Spektren für identische Mikroskopeinstellungen und ähnliche Präparate im Energiebereich von 0 eV bis 2200 eV aufgenommen mit: GEM (SuperATW)-Germanium Detektor mit ultradünmem Plastfenster und Si(Li) (Be window)—Silizium Detektor mit Beryllium-Fenster (8  $\mu$ m) .....15
- Abb. 3-1 Darstellung eines THF-Filters der Größe m=7 und n=8 (Empfehlung aus (Statham, 1977)), angepasst auf Kanalbreite von 10 eV. Statham hatte m=3 und n=4 für eine Kanalbreite von 20 eV vorgeschlagen. ....19
- Abb. 3-2 original: gemessenes Spektrum mit charakteristischen Peaks und Kontinuum; gefiltert: mit Top-Hat-Filter gefiltertes Spektrum .....19
- Abb. 3-3 Nach Filterung mit Top-Hat-Filter der Dimension m=7; n=8 verbliebenes Kontinuum bei einem der Kramers Gleichung gehorchenden Kontinuumverlauf mit einer Größe von 200 Counts pro Kanal bei einer Energie von 3.69 keV. ....20
- Abb. 3-4 Zeitabhängiger Verlauf der normierten Zählrate (die Zählrate für jeweils 100 s Messzeit wurde auf die durchschnittlichen Zählrate für gesamte Messzeit bezogen) für Kontinuum und charakteristische Strahlung von Kalium eines KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Dextran-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für je 5 Messungen. ....25
- Abb. 3-5 Zeitabhängiger Verlauf der normierten Zählrate (die Zählrate für jeweils 100 s Messzeit wurde auf durchschnittlichen Zählrate für die gesamte Messzeit bezogen) für Kontinuum und charakteristische Strahlung von Kalium eines KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Albumin-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für je 5 Messungen. ....26
- Abb. 3-6 Zusammenhang zwischen gemessener Kaliumkonzentration in einem Albumin-KCl-Standard und Verhältnis der charakteristischen Peaks von Schwefel und Kalium; die lineare Regression ergab dabei einen Anstieg der Geraden von B=-721 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> und ein Absolutglied von A=1117 mmol (kg d.w.)<sup>-1</sup> bei einem Regressionskoeffizienten von R=-0.878 und N=56 Messungen. ....27
- Abb. 3-7 Verlauf der auf die Konzentration des jeweiligen Elementes bei 900 nAs normierten Konzentrationen der wesentlichen in Microline enthaltenen Elemente in Abhängigkeit von der Elektronendosis pro Messfläche.....30

Abb. 3-8	Vergleich von berechneten und gemessenen Standardfaktorenverhältnissen für biologisch und messtechnisch interessante Elemente .....	33
Abb. 3-9	Vergleich der gemessenen und von Oxford-Instruments angegebenen Absorptionskurven des Detektorfensters; die Fehlerbalken bei den gemessenen Werten stellen die Standardabweichung für N=5 Messungen dar. ....	33
Abb. 4-1	Siliziumkonzentration in verschiedenen Kompartimenten von Ventrikelzellen vom Meerschwein. Dargestellt sind Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung sowie die minimale und maximale ermittelte Konzentration. Die Zahlen über den Säulen geben die Anzahl der jeweiligen Messungen an. ...	36
Abb. 4-2	Elektronenbild und Verteilung von Kalium, Phosphor und Silizium in einem Schnitt einer Ventrikelzelle des Meerschweins; m- Mitochondrien, cy- Cytosol, ECS- Extrazellularraum (engl.: extra cellular space; Tyrodelösung), film- Pioloformfilm.....	37
Abb. 4-3	Einfluss der Siliziumkorrektur auf die Bestimmung des Mittelwertes von $Z^2/A$ . Vergleich der Werte mit und ohne Korrekturrechnung.....	39
Abb. 4-4	Einfluss der Siliziumkorrektur auf die Elementkonzentration in verschiedenen Kompartimenten von Ventrikelmyozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der prozentualen Unterschiede zwischen Konzentrationen mit und ohne Korrekturrechnung für Silizium. Zusätzlich dargestellt sind die kleinste und die größte bei der Korrekturrechnung aufgetretene Abweichung. Die Zahlen über den Säulen geben die Anzahl der jeweiligen Messungen an. ....	40
Abb. 4-5	Abhängigkeit der Siliziumkonzentration der mit Parafilmdeckpapier aufgenommenen Pioloformfilme von der Trockenzeit. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen für jeweils 6 Messungen.....	41
Abb. 4-6	Geometrische Verhältnisse zwischen Probe, Detektor und Elektronenstrahl unter Standardmessbedingungen ( $e^-$ - einfallender Elektronenstrahl, $\gamma$ – in Richtung Detektor aus der Probe austretende Röntgenstrahlung).....	43
Abb. 4-7	Darstellung der Messgeometrie bei senkrechten Strukturen S der Breite B und um $30^\circ$ gekippten Proben der Dicke D. $\Delta x$ ist der Bereich, in dem mit dem Elektronenstrahl Teile der Struktur getroffen werden. $D_S$ ist der Durchmesser des Elektronenstrahls.....	45
Abb. 4-8	Linescan über die Kante eines 95 nm dicken Aralditschnittes. Dargestellt ist die Größe des Kontinuums. Es wurden alle 10 nm mit einem Spot von 16 nm für 30 s Spektren gesammelt und analysiert. A: Scanrichtung durch die Probe senkrecht zur Kippachse des Probenhalters. B: Scanrichtung parallel zur Kippachse des Probenhalters. ....	46
Abb. 4-9	A. Zusammenhang zwischen Kontinuum und Fehler bei der Bestimmung des Peakintegrals von Calcium ( $\sigma(Pa_{Ca})$ ) für Si(Li)-Detektor und Germaniumdetektor (GEM) B. Abhängigkeit des Verhältnisses der Fehler bei Si(Li)- und GEM-Detektor vom Kontinuum .....	48
Abb. 4-10	Massendicken von Messungen im Cytosol von Ventrikelmyozyten der Ratte in Abhängigkeit vom Datum der Messung.....	52
Abb. 4-11	Abhängigkeit des Massendickenverhältnisses von Mitochondrien und Cytosol vom Lebensalter für Messungen an Ventrikelmyozyten von Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrem Fehler (SEM). Zwischen dem Wert bei einem Alter von 3 Monaten und dem Wert bei einem Alter von 24 Monaten ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von kleiner 0.05. ....	53
Abb. 4-12	Zusammenhang zwischen Trockenanteil d und Wasseranteil f für ein Kompartiment der Zelle (Index K) und den Extrazellularraum (Index E).....	53
Abb. 4-13	Zusammenhang zwischen Massendicke und Trockenanteil für Albuminstandards. Die Fehlerbalken stellen jeweils die Standardabweichung dar. Die lineare Regression liefert einen Anstieg von $B=0.00664$ bei einem Regressionskoeffizienten von $R=1$ . Die Zahlen neben den Messpunkten stellen die Anzahl der Messungen pro Punkt dar. ....	55

Abb. 5-1	Korrelation zwischen der Höhe des Kontinuums bei der Energie von $\text{Ca}_{\text{K}\alpha}$ und dem Faktor K aus Gleichung 5-2; die lineare Regression aus $N=614$ Werten ergibt einen Anstieg der Geraden von $B=0.03852$ bei einem Regressionskoeffizienten von $R=0.9998$ .....	57
Abb. 5-2	Korrelation zwischen dem aus MLSQ-Fit ermittelten Kontinuumintegral zwischen 1 keV und 5 keV und der Höhe des Kontinuums bei der Energie von $\text{Ca}_{\text{K}\alpha}$ ; die lineare Regression an $N=614$ Werte ergibt einen Anstieg der Geraden von $B=566.6$ bei einem Regressionskoeffizienten von $R=0.998$ .....	58
Abb. 5-3	Vergleich zwischen theoretischer Poissonverteilung $p(n)$ mit dem Erwartungswert $\lambda=20$ und mittels stochastischer Simulation erzeugten Verteilungen .....	59
Abb. 5-4	Abhängigkeit der Calciumkonzentration vom zur Analyse verwendeten Top-Hat-Filter bei glatten Spektren, einem Kontinuum von 200 Counts bei der Energie von $\text{Ca}_{\text{K}\alpha}$ und einer Kaliumkonzentration von $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ; die vorgegebene Calciumkonzentration war $0 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ .....	60
Abb. 5-5	Abhängigkeit der Calciumkonzentration in $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ vom zur Analyse verwendeten Top-Hat-Filter bei glatten Spektren, einem Kontinuum von 100 Counts bei der Energie von $\text{Ca}_{\text{K}\alpha}$ und einer Kaliumkonzentration von $700 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ .....	60
Abb. 5-6	Abhängigkeit der Standardabweichung der Calciumkonzentration in $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ vom zur Analyse verwendeten Top-Hat-Filter bei stochastisch verrauschten Spektren, einem Kontinuum von 200 Counts bei der Energie von $\text{Ca}_{\text{K}\alpha}$ und einer Kaliumkonzentration von $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ .....	61
Abb. 5-7	Abhängigkeit der Standardabweichung der K-Konzentration in $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ vom zur Analyse verwendeten Top-Hat-Filter bei stochastisch verrauschten Spektren, einem Kontinuum von 200 Counts bei der Energie von $\text{Ca}_{\text{K}\alpha}$ und einer Kaliumkonzentration von $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ .....	62
Abb. 5-8	Spektrum mit Kaliumpeak bei einer Kaliumkonzentration von $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ , Top-Hat-Filter mit $m=13$ und $n=5$ bei verschiedenen Mittenenergien, 1 (durchgezogene Linie) für Kalium- $\text{K}\alpha$ -Peak, 2 (gestrichelte Linie) für Kalium- $\text{K}\beta$ -Peak und 3 (gepunktete Linie) für Calcium- $\text{K}\alpha$ -Peak .....	63
Abb. 5-9	Zusammenhang zwischen Standardabweichung der mittels MLSQ-Fit bestimmten Calciumkonzentration und Größe des Kontinuums an der Energie von $\text{Ca-K}\alpha$ ohne Kaliumpeak; die Regression an eine Potenzfunktion ergab als Potenz $b=-0.478$ bei einem Regressionskoeffizienten von $R^2=0.9998$ .....	64
Abb. 5-10	Zusammenhang zwischen Standardabweichung der mittels MLSQ-Fit bestimmten Calciumkonzentration und Größe des Kontinuums an der Energie von $\text{Ca}_{\text{K}\alpha}$ bei einer Kaliumkonzentration von $300 \text{ mmol (kg d.w.)}^{-1}$ ; die Regression an eine Potenzfunktion ergab als Potenz $b=-0.481$ bei einem Regressionskoeffizienten von $R^2=0.9998$ .....	65
Abb. 5-11	Zusammenhang zwischen Mittelwert $[\text{Ca}]$ und Standardabweichung $\sigma[\text{Ca}]$ der Calciumkonzentration und in Probe enthaltener Kaliumkonzentration $[\text{K}]$ ; a, b, c sind die Koeffizienten bei der Regression einer Potenzfunktion an die Werte von $\sigma[\text{Ca}]$ unter Berücksichtigung der Höhe des Kontinuums; $R^2$ gibt den jeweiligen Regressionskoeffizienten an. ....	66
Abb. 5-12	Abhängigkeit der Standardabweichung der Calciumkonzentration in $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ von der Höhe des Kontinuums bei 3.69 keV und der im Messbereich enthaltenen Kaliumkonzentration bei einem Top-Hat-Filter von $m=13$ ; $n=5$ .....	67
Abb. 5-13	Zusammenhang zwischen Schwankungen in der Detektorauflösung ( $\Delta\text{FWHM}$ , Abweichungen zur FWHM des Kaliumprofils von 99 eV) und der mittleren Konzentration von Calcium $[\text{Ca}]$ ; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung für 10000 simulierte Spektren dar. ....	68
Abb. 5-14	Zusammenhang zwischen Schwankungen in der Energieskala des Detektors (Position des Kaliumpeaks im simulierten Spektrum im Vergleich zur Position des Kaliumprofils, $\Delta E_{\text{K}\alpha}$ ) und der mittleren Konzentration von Calcium; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung für 10000 simulierte Spektren dar.....	69
Abb. 5-15	Vergleich zweier Profile von Kalium (nur $\text{K}\beta$ -Peak dargestellt). Profil1 aus dickerer Kristallstruktur mit erkennbarer Absorptionskante und Profil2 aus dünner Kristallstruktur ( $<150 \text{ nm}$ ) aufgenommen .....	70

- 
- Abb. 5-16 Durch das Netz entstehender Kontinuumanteil in Abhängigkeit von der Entfernung des Messbereiches von der Maschenmitte bei Messungen an Pioloformfilm mit einem Strahlstrom von 3.5 nA. Es wurde jeweils der Anteil für Bereiche von 1 keV Breite bestimmt. ....72
- Abb. 5-17 Abhängigkeit des Verhältnisses zwischen der Intensität des Kalium-K $\alpha$ -Peaks und der Intensität des Kalium-K $\beta$ -Peaks (K-K $\alpha$ /K-K $\beta$ ) von der Zählrate für Kohlenstoff. Dargestellt sind 966 Einzelmessungen an Mitochondrien und Cytosol von Rattenventrikelmyozyten. ....74
- Abb. 5-18 Kalium-K $\beta$ -Peak für verschiedene Totzeiten, relative Intensität im Vergleich zum Kalium-K $\alpha$ -Peak .....75
- Abb. 6-1 A: Verlauf der zeitabhängigen Konzentrationen normiert auf den Messwert nach 60 Sekunden für die Matrixelemente Kohlenstoff und Sauerstoff, sowie das externe Element Silizium bei cytosolischen Messungen an Ventrikelmyozyten der Ratte B: Elementkonzentration mit Standardabweichung für die Probenelemente Kalium, Calcium, Chlor, Phosphor und Schwefel; alle Messpunkte sind Mittelwerte für jeweils 60 Sekunden Messzeit bei 5 Proben normiert auf den Messpunkt nach 60 Sekunden.....79
- Abb. 6-2 A: Verlauf der zeitabhängigen Konzentrationen normiert auf den Messwert nach 60 Sekunden für die Matrixelemente Kohlenstoff und Sauerstoff, sowie das externe Element Silizium bei Messungen an Mitochondrien von Ventrikelmyozyten der Ratte B: Elementkonzentrationen mit Standardabweichung für die Probenelemente Kalium, Chlor, Phosphor und Schwefel; alle Messpunkte sind Mittelwerte für jeweils 60 Sekunden Messzeit bei 5 Proben en normiert auf den Messpunkt nach 60 Sekunden .....80
- Abb. 6-3 Vergleich zwischen den Mittelwerten der Calciumkonzentrationen in Mitochondrien von SHR- und WKY-Ratten in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle. Zusätzlich angegeben sind signifikante Unterschiede mit Signifikanzniveau ( $p < 0.05$ ). Die Fehlerbalken stellen den Fehler des Mittelwertes (SEM) dar. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der jeweiligen Messungen an. ....90



## Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1	gemessene und der Literatur entnommene (Jarosewich <i>et al.</i> , 1979) Konzentrationen im mineralischen Standard Microline, sowie die Verhältnisse zwischen gemessenen und Literaturwerten....	30
Tab. 3-2	Gemessene und theoretisch berechnete Standardfaktorenverhältnisse der biologisch interessanten und der in Film, Halter und Netz vorkommenden Elemente, jeweils bezogen auf Kalium. ....	32
Tab. 4-1	Abweichungen der Konzentrationen durch extrazelluläre Überlagerungen verschiedener Größe (5, 10, 25 % Ül. – Überlagerung) für das Kompartiment Cytosol (311 Messungen), alle Konzentrationsangaben in mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> .....	47
Tab. 4-2	Abweichungen der Konzentrationen durch extrazelluläre Überlagerungen verschiedener Größe (5, 10, 25 % Ül. – Überlagerung) für das Kompartiment Mitochondrien (319 Messungen), alle Konzentrationsangaben in mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> .....	47
Tab. 4-3	Messergebnisse mit Standardabweichungen (bei Makrofol berechneter Messfehler) und berechnete Werte für Massendicke und Schnittdicke für verschiedene Standards sowie Messungen an Rattenventrikelmyozyten. Die mit * gekennzeichneten Dichten sind geschätzt, die mit # gekennzeichneten Dicken beziehen sich auf voreingestellten Schnittdicken am Ultrakryomikrotom. ....	50
Tab. 4-4	Aus mittlerer Massendicke berechneter Wassergehalt (Mittelwert±Standardabweichung) für Herzmuskelzellen von Mensch und Ratte. N ist die Anzahl der berücksichtigten Messungen. Literaturwerte für Mitochondrien der Ratte aus (von Zglinicki, 1988) und Werte für Cytosol (A-Bande) aus (von Zglinicki <i>et al.</i> , 1987) .....	55
Tab. 5-1	Vergleich der mit verschiedenen Profilen berechneten Konzentrationen in mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> für Kalium und Calcium in Cytosol und Mitochondrien (Mito.) von Ratten. Verwendet wurden Daten eines Tieres (N=44 Messungen für Cytosol und N=50 Messungen für Mitochondrien) .....	71
Tab. 5-2	Konzentrationen und Korrekturfaktoranteile der von uns verwendeten biologischen Matrix (bei einer nur aus der organischen Matrix bestehenden Probe) .....	73
Tab. 6-1	Physiologische und morphologische Parameter der untersuchten Ratten. Gegeben ist jeweils der Mittelwert mit seinem Standardfehler (SEM) für jeweils 10 Tiere. * bedeutet signifikanter Unterschied auf dem 0.05 Niveau und ** auf dem 0.001 Signifikanzniveau. ....	77
Tab. 6-2	Anzahl der an Ventrikelmyozyten von SHR- und WKY-Ratten durchgeführten und zur Berechnung der Elementkonzentration zur Verfügung stehenden Messungen. ....	77
Tab. 6-3	Vergleich der Mittelwerte der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> , berechnet mit verschiedenen Top-Hat-Filtern. ....	81
Tab. 6-4	Vergleich der Mittelwerte der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> berechnet mit Siliziumkorrektur nach Gleichung 4-1 (mit SiK) und ohne Korrektur für Siliziumkontamination (ohne SiK). ....	82
Tab. 6-5	Vergleich der Mittelwerte der Kaliumkonzentrationen im Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> berechnet mit Siliziumkorrektur nach Gleichung 4-1 (mit SiK) und ohne Korrektur für Siliziumkontamination (ohne SiK) .....	83
Tab. 6-6	Vergleich der Mittelwerte der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> berechnet mit Korrektur für Änderungen der Detektorfunktion (mit K) und ohne Korrektur (ohne K). ....	83
Tab. 6-7	Vergleich der Mittelwerte der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in mmol (kg d.w.) <sup>-1</sup> berechnet für alle Messungen (alle) mit Lösung aus Extrazellularraum überlagerte (über) und nicht überlagerte (ohne) Messungen. ....	85

---

Tab. 6-8	Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ berechnet für alle Messungen (alle), die nach Korrekturen aus Kapitel 6.3 noch verwendet wurden, für Messungen, die Schnittdickeneinfluss unterlagen (doü) und die Messungen nach Elimination der beeinflussten Messungen (korr) .....	86
Tab. 6-9	Vergleich der Totzeit in % und der Zählrate von Kohlenstoff in Counts (Impulsen) pro Sekunde (cps) der für die Erstellung des Kaliumprofils verwendeten Messung mit den Mittelwerten dieser Größen für Messungen an Mitochondrien (Mito) und am Cytosol (Cyto) von WKY- und SHR-Ratten .....	88
Tab. 6-10	Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien und Cytosol von WKY- und SHR-Ratten in $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ berechnet für alle Messungen (alle) und verschiedene nach der Totzeit ausgewählte Bereiche .....	88
Tab. 6-11	Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien von WKY- und SHR-Ratten in $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle .....	89
Tab. 6-12	Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciumkonzentrationen von Mitochondrien in $\text{mmol (kg d.w.)}^{-1}$ in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Zelle vor und nach Berücksichtigung von Korrekturen. Die Daten wurden dabei nach Gruppe der Tiere (WKY- und SHR-Ratten) getrennt. ....	90

**Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Formelzeichen**

$A_i$	Atomare Masse (Molekulargewicht) des chemischen Elementes $i$
ATW	Athmospheric thin window, dünnes Detektorfenster
$c_i$	Konzentration des Elementes $i$
cps	Counts per second, Impulse pro Zeiteinheit, Maß für die Zählrate
Cyt, Cyto	Cytosol
$d$	Trockengehalt des Kryoschnittes vor dem Gefriertrocknen
$D$	Dicke eines Kryoschnittes nach dem Gefriertrocknen
Diff.	Differenz zweier Mittelwerte
d.w.	dry weight, Bezug auf das Messvolumen im gefriergetrockneten Schnitt
EPMA	Electron probe microanalysis, Elektronenstrahlmikroanalyse
$f$	Wassergehalt des Kryoschnittes vor dem Gefriertrocknen
FWHM	Full Width at Half a Maximum Height, Maß zur Bestimmung der Detektorauflösung über Breite der Peaks
GEM	Energiedispersiver Germaniumdetektor der Firma Oxford Instruments, Oxford
$K_{\text{abs}}$	Absorptionskoeffizient
MDV	Massendicken-Verhältnis, Verhältnis der Massendicken zweier Kompartimente
Mit, Mito	Mitochondrien
MLSQ	Multiple Least Square Fit
$N$	in den meisten Tabellen für Anzahl der Messungen verwendet
$Pa_i$	Peak area des Elementes $i$ , Summe der Impulse im Spektrum einer charakteristischen Linie des Elementes $i$
SD	Standard deviation, Standardabweichung der Verteilung
SEM	Standard error of the mean, Fehler des Mittelwertes
SHR	Spontan hypertensive rats, Ratten die genetisch bedingt Bluthochdruck entwickeln
STEM	scanning transmission electron microscope, Transmissionselektronenmikroskop mit zusätzlicher Scan-Einheit
$STF_i$	Standardfaktor des Elements $i$
THF	Top-Hat-Filter
t-Wert	t-Wert der „Student“ t-Verteilung
$W$	Kontinuumintegral, Bremsstrahlungsanteile in einem vorgegebenen Energiebereich des Spektrums
WKY	Ratten vom Stamm Whistar Kyoto
$Z^2/A$	Ordnungszahlkorrektur der Bremsstrahlung
$Z_i$	Ordnungszahl des chemischen Elementes $i$
$\rho$	Dichte eines Stoffes
$\rho D$	Massendicke
$\sigma$	Streuung oder Standardabweichung einer Zufallsgröße

## Mathematische Ergänzungen

Wichtungsmatrix  $\mathbf{M}$  mit Matrixelementen  $M_{ij}$

Gemessenes Originalspektrum  $S(E)$  mit Intensität  $S_i$  im Energiekanal  $i$

Top-Hat-Filter  $h_k$  mit Breite  $2s+1$  mit  $s=m+n$ :

$$(1) \quad h_k = \begin{cases} \frac{1}{2m+1} & \text{für } |k| \leq m \\ \frac{1}{2n} & \text{für } m < |k| \leq m+n \end{cases}$$

Top-Hat-gefiltertes Spektrum  $S^*(E)$  mit Intensität  $S_i^*$  im Energiekanal  $i$ :

$$(2) \quad S_i^* = \frac{1}{2m+1} \sum_{k=-n}^n S_{i+k} - \frac{1}{2n} \left( \sum_{k=-(n+m)}^{-(n+1)} S_{i+k} + \sum_{k=n+1}^{n+m} S_{i+k} \right)$$

Für die Intensitäten im Kanal  $i$   $S_i$  und  $S_i^*$  gilt: Sie sind Realisierungen der poissonverteilten Zufallsgrößen  $S_i$  und  $S_i^*$

Im folgenden bedeuten:

$E$  – Erwartungswert einer Zufallsgröße,

$var$  – Varianz einer Zufallsgröße,

$cov$  – Kovarianz zweier Zufallsgrößen.

Für die Matrixelemente  $M_{ij}$  der Wichtungsmatrix  $\mathbf{M}$  gilt:

$$(3) \quad M_{ij} = cov(S_i^* S_j^*) = E(S_i^* S_j^*) - E(S_i^*) E(S_j^*) \quad \text{mit}$$

$$(4) \quad E(S_i^*) = E\left(\sum_{k=-s}^s h_k S_{i+k}\right) = \sum_{k=-s}^s h_k E(S_{i+k})$$

$$(5) \quad E(S_j^*) = E\left(\sum_{l=-s}^s h_l S_{j+l}\right) = \sum_{l=-s}^s h_l E(S_{j+l})$$

$$(6) \quad E(S_i^* S_j^*) = E\left(\sum_{k=-s}^s h_k S_{i+k} \sum_{l=-s}^s h_l S_{j+l}\right) = \sum_{k=-s}^s \sum_{l=-s}^s h_k h_l E(S_{i+k} S_{j+l})$$

und somit:

$$(7) \quad M_{ij} = cov(S_i^* S_j^*) = \sum_{l=-s}^s \sum_{k=-s}^s h_k h_l E(S_{i+k} S_{j+l}) - \sum_{k=-s}^s h_k E(S_{i+k}) \sum_{l=-s}^s h_l E(S_{j+l}) \text{ bzw.}$$

$$(8) \quad M_{ij} = \sum_{l=-s}^s \sum_{k=-s}^s h_k h_l (E(S_{i+k} S_{j+l}) - E(S_{i+k}) E(S_{j+l}))$$

Da die  $S_i$  im Originalspektrum unabhängige poissonverteilte Zufallsgrößen sind, gilt:

(9)  $E(S_i) = \lambda_i \cong S_i$  und

(10)  $E(S_i S_j) = \begin{cases} E(S_i) E(S_j) & \text{für } i \neq j \\ E(S_i^2) & \text{für } i = j \end{cases}$  sowie

(11)  $\text{var}(S_i) = E(S_i^2) - E(S_i)^2 = \sigma^2(S_i) = \lambda_i \cong S_i$

damit ergibt sich für:

(12)  $E(S_{i+k} S_{j+1}) - E(S_{i+k}) E(S_{j+1}) = \begin{cases} E(S_{i+k}) E(S_{j+1}) - E(S_{i+k}) E(S_{j+1}) = 0 & \text{für } i+k \neq j+1 \\ E(S_{i+k}^2) - E(S_{i+k})^2 & \text{für } i+k = j+1 \end{cases}$

(13)  $i+k=j+1$  bzw.  $l=i-j+k$

Somit folgt mit (12) und (13) aus (8):

(14)  $M_{ij} = \sum_{k=-s}^s h_k h_{i-j+k} (E(S_{i+k}^2) - E(S_{i+k})^2)$

Mit (9) und (11) ergibt sich so die Bildungsvorschrift für die Matrixelemente  $M_{ij}$  der Wichtungsmatrix  $\mathbf{M}$  zu:

(15)  $M_{ij} = \sum_{k=-s}^s h_k h_{i-j+k} S_{i+k}$

Für die Bestimmung von  $h_k$  siehe (1).

## **Danksagung**

Recht vielen Dank möchte ich der Leiterin der Abteilung Physiologie der Zellkompartimente des Julius-Bernstein-Institutes der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Frau Prof. Dr. rer. nat. Maria Fiora Gallitelli, sagen. Ohne meine Anstellung in Ihrer Abteilung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vor allem gilt ihr mein Dank dafür, dass sie mir trotz der Vielzahl an biologischen Fragestellungen Zeit und Gelegenheit zu methodischen Untersuchungen und damit zu einer Promotion auf dem Gebiet der Physik gegeben hat. Dabei stand sie mir immer mit persönlichem Rat und fachlichen Hinweisen zur Seite.

Mein Dank gilt Herrn Diplomphysiker Frank Rudolf für die Unterstützung bei den Messungen am Elektronenmikroskop und das Überlassen der morphologischen und physiologischen Daten aus den Versuchen mit den Ventrikelmyozyten der Ratte (Tabelle 6-1). Weiterhin danke ich ihm für die konstruktive Zusammenarbeit bei gerätetechnischen Problemen und als Diskussionspartner.

Sehr großer Dank gilt Frau Nicole Walter, ohne deren großes präparatives Geschick beim Kryoschneiden und im Labor die meisten der Präparate gar nicht erst den Weg zur Mikroanalyse im Elektronenmikroskop gefunden hätten.

Mein Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Andreas Röder für die Betreuung der Arbeit von der Seite des Fachbereichs Physik der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und für seine Vorschläge zur Ergänzung und Vervollkommnung der Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Klöck vom Fachbereich Geowissenschaften der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die freundliche Überlassung der mineralischen Standards.

Für die Mühe bei der Überarbeitung des Manuskriptes bedanke ich mich besonders bei Herrn Dr. rer. nat. Andreas Christ.

Großer Dank gilt meiner Familie für die Geduld und den Glauben an einen erfolgreichen Abschluss dieser Etappe meiner akademischen Laufbahn.

Recht herzlicher Dank gilt vor allem meiner Frau Katrin für die liebevolle Pflege daheim und das Ermöglichen von Erholungsschlaf in der letzten Phase der Arbeit.

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt sowie die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe mich zuvor noch nicht um den Doktorgrad beworben.

Lützen, den 06.07.2001

## **Angaben zur Person**

### **persönliche Daten**

Name: Michael Schultz  
Geburtsdatum: 07.05.1967  
Geburtsort: Prenzlau  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

### **Ausbildung**

1973-1983 Polytechnische Oberschule in Nebra  
1983-1985 Spezialklassen der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit Abschluss Abitur  
1987-1993 Studium der Physik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit Abschluss Diplom  
1996-1998 berufsbegleitendes Studium Medizinische Physik an der Hochschule für Wirtschaft und Technik Mittweida

### **Wehrdienst**

1985-1987 Landstreitkräfte der NVA der DDR

### **berufliche Tätigkeit**

1993-1996 Drittmittelprojekte im Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1996-2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Julius-Bernstein-Institut der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Lützen, den 06.07.2001