INAUGURAL – DISSERTATION zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg

> vorgelegt von Dipl.-Phys. Ingo Janke aus Nettetal

Tag der mündl. Prüfung: 22. Dezember 2004

Anwendung von Weitfeldmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung für funktionelle Hirnabbildung

Gutachter:

Prof. Dr. Winfried Denk

Prof. Dr. Josef Bille

Zusammenfassung

Der Vorteil der Weitfeldmikroskopie bei der funktionellen Hirnabbildung gegenüber der oft angewendeten Laserscanningmikroskopie ist, daß sie eine parallele Aufnahme an Dabei ist jedoch Stellen mit hoher Geschwindigkeit erlaubt. vielen eine Tiefendiskrimination der Signale nur sehr eingeschränkt möglich. In dieser Arbeit wird erstmals untersucht, wie die Methode der strukturierten Beleuchtung, mit der optische Schnittbildung in die Weitfeldmikroskopie eingeführt wird, für die funktionelle Hirnabbildung eingesetzt werden kann. Es mußte eine andere Art der Gitterbewegung für Aufnahmen mit hoher Geschwindigkeit und ein neuer Algorithmus zur Gewinnung schneller und schwacher Infokussignale entwickelt werden. Damit konnten in vitro funktionelle Signale gemessen und es konnte in vivo gezeigt werden, wie Außerfokuslicht die Intensität von Infokusstrukturen im konventionellen Weitfeldbild als umgekehrt erscheinen lassen kann. Es zeigte sich, daß das Signal-zu-Rausch Verhältnis im Vergleich zum konventionellen Weitfeldmikroskop durch Licht reduziert wird, das vor der Anwendung des Schnittbildungsalgorithmus auch von außerhalb der optischen Schnittdicke detektiert wird. Daher ist eine dem Laserscanningmikroskop vergleichbare Schnittdicke nicht sinnvoll, es wurde eine Schnittdicke von 90 um realisiert, die ungefähr der Breite einer Hirnschicht einer Maus entspricht. Als zweiter maßgeblicher Faktor für das Signal-zu-Rausch Verhältnis erwies sich die Streuung im Gehirn, die die Infokusmodulation abschwächt. Deren Einfluß kann durch eine größere Anregungswellenlänge und breitere Gitterstreifen reduziert werden, ohne die Schnittdicke stark zu verbreitern.

Abstract

In functional brain-imaging the advantage of wide-field microscopy versus the frequently used laser-scanning microscopy is the possibility of simultaneous recording at different locations with high speed. However, in doing so depth discrimination of the signals is very restricted. In this thesis it is investigated for the first time how the method of structured illumination which introduces optical sectioning into wide-field microscopy can be used for functional brain imaging. A new technique of grating movement for high speed recording with high velocity and a new algorithm to extract fast and weak in-focus signals had to be developed. Thus functional signals could be detected in vitro. Furthermore it was shown in vivo how out-of-focus light lets the intensity of in-focus structures seem reversed in the conventional wide field image. In comparison to the conventional wide-field microscope the signal-to-noise ratio is reduced by light detected from beyond the optical sectioning strength before the sectioning algorithm is applied. Hence the optical sectioning strength used in laser scanning microscopy is not applicable here. A sectioning strength of 90 µm which roughly corresponds to the thickness of one cortical layer in mouse was realized. The second relevant factor for the signal-to-noise ratio was scattering in the brain which diminished the in-focus modulation. Its effect can be reduced by a longer excitation wavelength and wider grating bars without strongly broadening sectioning strength.

INHALT

1 EINL	EITUNG	1
2 OPTI	SCHE SCHNITTBILDUNG IN DER WEITFELDMIKROSKOPIE	
DURCH S	STRUKTURIERTE BELEUCHTUNG	5
21 V	WEITEELDMIKROSKOPIE	5
2.1 (PPTISCHE SCHNITTBILDUNG DURCH STRUKTURIERTE BEI EUCHTUNG	5
2.2	Die ontische Transferfunktion	10
2.2.2	Konventionelle Extraction des Infokussignals.	. 18
2.2.3	Laterale Auflösungsverbesserung durch strukturierte Beleuchtung	. 20
2.3 (OPTISCHE SCHNITTBILDUNG IN BIOLOGISCHEM GEWEBE	. 20
2.4 A	ANDERE ANSÄTZE FÜR OPTISCHE SCHNITTBILDUNG IN HIRNGEWEBE	. 24
3 IMPI	LEMENTIERUNG DER STRUKTURIERTEN BELEUCHTUNG FÜI Kodie im genunn	R
MIKKUS	KOPIE IM GEHIKN	. 2 /
3.1 I	Der Aufbau	. 27
3.1.1	Optik	. 27
3.1.2	Kamera	. 30
3.1.3	Lichtquelle	. 32
3.2 I	DEMODULATION FÜR OPTISCHE SCHNITTBILDUNG	. 32
3.2.1	Probleme der Standardmethode	. 32
3.2.2	Extraktion des Infokussignals durch Quadraturdemodulation	. 33
3.2.3	Simulation und Vergleich	. 38
3.2.4	Berechnung der konventionellen Weitfeldbilder	. 44
3.3 (JITTER UND GITTERBEWEGUNG	. 44
3.3.1	Siemensstern	. 45
3.3.2	Phasenstarrer Regelkreis (PLL)	. 45
3.3.3	Motorentwurf	. 46
3.3.4	Entwurf des PLL	. 49
4 CHA	RAKTERISIERUNG DES AUFBAUS	. 53
4.1 N	MODULATIONSAMPLITUDE	. 53
4.1.1	Messung mit einer dünnen fluoreszenten Schicht	. 53
4.1.2	Vergleich der gemessenen Modulationsamplitude mit der theoretischen	
Erwai	rtung	. 55
4.1.3	Streuung	. 58
4.1.4	Messung im Gewebephantom	. 59
4.1.5	Messung in Hirngewebe	. 62
4.1.6	Vergleich der gemessenen Modulationsamplitude mit der theoretischen	
Erwai	rtung	. 62

4.2 AXIALE ANTWORT	68
4.2.1 Messung	68
4.2.2 Vergleich der gemessenen axialen Antwort mit der theoretischen	
Erwartung	69
4.3 OPTISCHE SCHNITTBILDUNG IM PHANTOM	71
4.4 TEST DES DEMODULATIONSALGORITHMUS QD-AS	73
4.5 WEITERE KOMPONENTEN DES AUFBAUS	73
4.5.1 Kamera	73
4.5.2 Auswirkung von Kamerasaturation auf die Modulationsamplitude	2 78
4.5.3 Siemensstern	79
4.5.4 PLL	80
MESSUNGEN IN HIRNGEWEBE	83
5.1 GEFÄRBTE BLUTGEFÄßE IN VIVO	
5.2 SYNAPTISCHE STIMULATION <i>IN VITRO</i>	
LIMITATIONEN FÜR DIE ANWENDUNG DER STRUKTURIER	ΓΕΝ
ELEUCHTUNG IM GEHIRN	97
6.1 SIGNAL-ZU-RAUSCH VERHÄLTNIS	97
6.2 FLUORESZENZ	
6.3 EINDRINGTIEFE	103
ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	105
ITERATUR	

1 Einleitung

Die Aufklärung der Funktionsweise des Gehirns ist auf verschiedenen Ebenen und mit unterschiedlichen Methoden angegangen worden. Ein Verständnis der Vorgänge in einzelnen Nervenzellen ist dafür sicher grundlegend; auf diesem Gebiet der Neurobiologie sind in der Vergangenheit auch große Fortschritte erzielt worden. Ein Charakteristikum von Nervenzellen ist jedoch ihr hoher Grad von Verknüpfung untereinander, so daß für ein weitergehendes Verständnis die Untersuchung des Gehirns ganzem und in voller Intaktheit, also in vivo naheliegend ist. Die als Informationsübertragung im Gehirn geschieht durch elektrische Ströme, die mit Elektroden gemessen werden können. Die gleichzeitige Beobachtung einer großen Zahl von Neuronen im Gehirn in vivo ist damit jedoch nicht möglich. Zu diesem Zweck werden verschiedene bildgebende Verfahren eingesetzt, die sich in ihrer räumlichen und zeitlichen Auflösung, in ihrer Invasivität und in den Vorgängen im Gehirn, die sie abbilden können, unterscheiden (für einen Überblick siehe (Toga and Mazziotta 2002)). Ein Beispiel ist die funktionelle Magnetresonanztomographie, mit der beispielsweise nichtinvasive Messungen des lokalen Blutflusses im gesamten Gehirn mit einer räumliche Auflösung von ca. 1 mm und ein zeitliche Auflösung von ca. 0,5 s durchgeführt werden können. Eine viel höhere räumliche und zeitliche Auflösung kann mit optischer Mikroskopie erreicht werden. Die Größenordnung der räumlichen Auflösung wird hier durch die Wellenlänge des verwendeten Lichts bestimmt, liegt also im Bereich von einigen hundert Nanometern oder darüber. Die Streuung des Lichts in Hirngewebe limitiert die Eindringtiefe, bei der noch abbildende Eigenschaften erreicht werden können, allerdings auf ca. 1mm.

Optische Bildgebung durch Weitfeldmikroskopie ist eine verbreitete Methode zur funktionellen Hirnabbildung (Grinvald, Frostig et al. 1988)(Grinvald, Shoham et al. 1999)(Zochowski, Wachowiak et al. 2000). Sie wird typischerweise eingesetzt, wenn "Karten" der funktionellen Aktivität im Kortex von Versuchstieren gemessen werden sollen, also eine parallele Aufnahme funktioneller Signale in einem Gebiet von bis zu mehreren Quadratmillimetern. Das Weitfeldmikroskop ist recht einfach zu realisieren und bietet durch den Einsatz von Weißlichtquellen in Verbindung mit optischen Filtern eine hohe Flexibilität bei der Anregung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, die in der biologischen Mikroskopie heute besondere Bedeutung erlangt haben.

Der Begriff "Karte" deutet bereits an, daß von dem dreidimensionalen Beobachtungsvolumen ein zweidimensionales Bild erzeugt wird, also räumliche Information verlorengeht. Für die Rückgewinnung der Information aus der dritten, der axialen Dimension, wurden verschiedene Methoden entwickelt, die darauf basieren, das Licht aus nur einer Ebene oder sogar einem beugungsbegrenzten Brennpunkt zu erhalten ((Koester 1995)und Referenzen darin). Diese Methoden werden mit dem Begriff optische Schnittbildung zusammengefaßt. Für die funktionelle Hirnabbildung mit Weitfeldmikroskopie wurde die Dekonvolution angewendet (Yae, Elias et al. 1992)(Fisher, Civillico et al. 2004), aber wesentlich größere Bedeutung hat die Laserscanning-Mikroskopie in der Ausführung als konfokales Mikroskop (Minsky 1961)(Minsky 1988) und als Multiphotonen-Mikroskop (Denk, Strickler et al. 1990) erlangt. Vor allem mit der Multiphotonen-Mikroskopie konnte eine reduzierte Gewebeschädigung und hohe Tiefeneindringung (Theer, Hasan et al. 2003) erreicht werden. Um mit dem Laserscanning-Mikroskop ein räumliches Bild des Objekts zu erhalten, muß es jedoch sequentiell abgerastert werden, was die zeitliche Auflösung reduziert. Der Vorteil der Weitfeldmikroskopie ist, an vielen Orten einer Ebene gleichzeitig das Bild aufnehmen zu können und die Gewebeschädigung nochmals zu reduzieren.

Im Jahr 1997 wurde eine Methode zur Tiefendiskrimierung in der Weitfeldmikroskopie durch räumliche und zeitliche Modulation des Lichts in einer dünnen Schicht des Objekts, die sogenannte strukturierte Beleuchtung vorgeschlagen (Neil, Juskaitis et al. 1997). Dies geschieht durch Abbildung eines Strichgitters in die Brennebene des Objektivs und die Translation dieses Gitters senkecht zu den Strichen. In den folgenden Jahren wurde die strukturierte Beleuchtung auch in biologischen Proben eingesetzt (Lanni and Wilson 2000)(Lagerholm, Vanni et al. 2003)(Cole, Siegel et al. 2001)(Elson, Siegel et al. 2002)(Webb, Gu et al. 2002), jedoch noch nicht für die funktionelle Hirnabbildung. Dies war Ziel dieser Arbeit.

Es gibt eine Reihe von Gehirnregionen, die primär die Steuerung niederer oder unbewußter Abläufe (Bewegung, Hormonausschüttung) ausführen wie das Kleinhirn oder die Hypophyse oder als Schaltstelle zwischen verschiedenen Teilen des Nervensystems fungieren wie der Hirnstamm. Von besonderem Interesse war und ist das Großhirn, und dort speziell die Großhirnrinde, der Kortex, in dem unter anderem die Sinneseindrücke verarbeitet werden. Dies findet in räumlich lokalisierbaren Arealen statt, die entsprechend benannt sind, so z.B. auditorischer Kortex, somatosensorischer Kortex usw. Die Zellen des Nervensystems werden Neurone genannt. Neurone bestehen aus dem Zellkörper und langen Auswüchsen, den Dendriten und Axonen, durch die sie Signale empfangen und weitergeben. Die beobachtbaren Änderungen im Gehirn, die durch die lokale Änderung von Ionenkonzentration oder Membranpotential hervorgerufen werden. und die wiederum mit dem Informationstransport zusammenhängen, werden im Folgenden funktionelle Signale genannt. Im Falle der optischen Mikroskopie müssen diese Signale in Lichtsignale umgewandelt werden. Im Kortex befinden sich komplette Neurone, der Teil des Großhirns unter dem Kortex enthält hauptsächlich axonale Verbindungen zwischen den Arealen des Kortex, dem Kortex und anderen Teilen des Gehirns sowie anderen Organen. Die Anordnung der Zellkörper zeigt dabei eine gewisse vertikale Struktur und bildet Schichten unterschiedlicher Dichte und unterschiedlicher Zelltypen. In jeder Schicht befinden sich auch axonale und dendritische Querverbindungen zwischen den Zellen. Es lassen sich grob 6 Schichten im Kortex identifizieren, die abhängig von der Gehirnregion mehr oder weniger deutlich voneinander getrennt werden können (Kandel, Schwartz et al. 2000). Licht im sichtbaren oder nahen infraroten Wellenlängenbereich, das auch noch abbildende Eigenschaften hat, dringt nicht mehr als ca. 1 mm in Hirngewebe ein, so daß mit optischer Mikroskopie nur oberflächennahe Schichten des Gehirns beobachtet werden können, v.a. eben der Kortex des Gross- und Kleinhirns. Die Signalverarbeitung im Kortex mit einer Auflösung von der Einzelzellebene bis zur Größe von wahrnehmungsverarbeitenden Arealen in kleinen Säugetieren wie Ratten ist also der optischen Mikroskopie zugänglich und gibt die typischen neurobiologischen Fragestellungen für Messungen in vivo vor. Natürlich sind auch Messungen an Gehirnschnitten mit lebendem Gewebe, also in vitro, möglich und wurden hier auch durchgeführt. Dadurch sind auch tiefergelegene Gehirnregionen für optische Messungen zugänglich. Bei Messungen in vivo wird eine Stimulation an einem Sinn des Tieres durchgeführt, z.B. durch Präsentation eines Geruchsstoffes. Außerdem muß sich ein optischer Signalstoff im Gewebe befinden. Dies kann ein intrinsische Substanz wie Hämoglobin im Blut oder die Streuung durch Zellen sein, ein genetisch exprimierter Farbstoff wie das grün fluoreszierende Protein GFP, oder ein künstlich eingebrachter Gewebefarbstoff. Im ersten Fall wird dann eine Änderung der Absorption oder Streuung gemessen, in den anderen Fällen die Fluoreszenz des Farbstoffs. Die Aufgabe der Mikroskopie besteht dann darin, das funktionelle Signal mit möglichst guter räumlicher und zeitlicher Auflösung, sowie möglichst hohem Signal-zu-Rausch Verhältnis aufzunehmen

Bei der Messung in vivo ist die Einzelzellauflösung die Domäne der Laserscanningmikroskopie, da ihr Beobachtungsvolumen im Bereich der Beugungsbegrenzung liegt. Sie stellt auch eine Art von strukturierter Beleuchtung dar. die Beleuchtungsstruktur ist der Fokus des Lasers. Sie wird zeitlich variiert, indem der Fokus durch das Objekt bewegt wird und dabei das Objekt dreidimensional abgerastert. Die Erweiterung auf viele Foki mit einer Weißlichtquelle in (Juskaitis, Wilson et al. 1996) kann dabei als Vorläufer der hier verwendeten Art der strukturierten Beleuchtung gelten. Das Signal-zu-Rausch Verhältnis wird bei diesen Methoden durch die Anzahl der aus dem (Laser-)Fokus detektierten Photonen begrenzt, sowie durch die Effektivität, mit der Außerfokuslicht ausgeblendet werden kann. Starke Streuung kann z.B. im konfokalen Mikroskop auch zu verstärkter Detektion von Außerfokuslicht führen, im Multiphotonenmikroskop kann dies durch Fluoreszenzanregung an der Oberfläche des Gehirns geschehen (Theer, Hasan et al. 2003). In beiden Mikroskopiemethoden werden recht hohe Anregungsintensitäten verwendet, die auch zu Gewebeschäden führen können (Svoboda, Tank et al. 2000).

Bei der Weitfeldmikroskopie werden geringere Anregungsintensitäten verwendet. Da bei der Weitfeldmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung immer auch das gesamte Außerfokuslicht detektiert wird, ist eine Ausdehnung der optischen Schnittdicke deutlich über die der Laserscanningmikroskopie angebracht, um das Signal-zu-Rausch Verhältnis nicht von vornherein zu sehr zu reduzieren. In der hier gewählten Implementierung wird die Schnittdicke ungefähr so breit wie eine Hirnschicht einer Maus gemacht. Das Objekt muß nicht gescannt werden, sondern der gesamte Infokusbereich wird zu jedem Zeitpunkt strukturiert beleuchtet und das Licht daraus detektiert. Dadurch gewinnt man vor allem eine höhere zeitliche Auflösung. Im Vergleich zum konventionellen Weitfeldmikroskop leistet die optische Schnittbildung mit strukturierter Beleuchtung dabei eine Verbesserung der axialen räumlichen Auflösung sowie die Möglichkeit zur besseren Lokalisierung und damit Identifizierung funktioneller Signale. Sie wird in das abbildende System eines konventionellen Weitfeldmikroskops eingefügt.

Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen der optischen Schnittbildung durch strukturierte Beleuchtung beschrieben und ein erster Ausblick auf die Anwendung im Gehirn gegeben. Das Kapitel 3 beschreibt, wie die Methode der strukturierten Beleuchtung umgesetzt wurde, um sowohl durch den Aufbau als auch durch den Algorithmus zur Gewinnung der optischen Schnittbilder den Anforderungen der Abbildung funktioneller Signale im Gehirn gerecht zu werden. Kapitel 4 enthält die Messungen, die diesen Aufbau charakterisieren. Dort wird auch ein Modell für die Abbildung des Strichgitters in einem streuenden Medium entwickelt. In Kapitel 5 werden die Ergebnisse von Messungen *in vivo* und *in vitro* gezeigt. Das Kapitel 6 faßt die Ergebnisse aller Messungen hinsichtlich der sich ergebenden Limitationen, insbesondere für das Signal-zu-Rausch Verhältnis, zusammen. Dort wird auch ein quantitatives Modell für das Signal-zu-Rausch Verhältnis bei optischer Schnittbildung mit strukturierter Beleuchtung entwickelt.

2 Optische Schnittbildung in der Weitfeldmikroskopie durch strukturierte Beleuchtung

Im vorigen Kapitel wurden verschiedene Möglichkeiten vorgestellt, wie bestimmte informationsverarbeitende Vorgänge oder ihre physiologischen Begleiterscheinungen im Gehirn durch Licht sichtbar gemacht werden können. Um diese Lichtsignale zu erzeugen, zu detektieren und zu speichern wird ein Mikroskop verwendet, in dem in der Regel ein Anregungs- sowie ein Detektionsstrahlengang realisiert ist. Am Ende des Detektionsstrahlengangs werden die Signale auf einen geeigneten Lichtdetektor abgebildet.

Hier wird nun zunächst der grundsätzliche Aufbau eines Weitfeldmikroskops sowie dessen Eigenschaften erläutert, soweit sie für die hier gestellte Aufgabe von Bedeutung sind. Anschließend wird gezeigt, wie sich mit strukturierter Beleuchtung optische Schnittbildung einführen läßt und welche unmittelbaren Konsequenzen sich damit für die Anwendung auf biologisches Gewebe ergeben.

2.1 Weitfeldmikroskopie

Das einfachste Mikroskop, daß nicht auf das Auge, sondern einen Lichtdetektor ohne eigene Linse abbildet, wird bereits durch zwei Linsen realisiert (Abbildung 2.1, siehe auch das Tandem-Linsen-System in (Ratzlaff and Grinvald 1991)). Die abbildenden Eigenschaften lassen sich bis auf Beugungungseffekte durch die geometrische Optik beschreiben. Ein Objekt in der Brennebene der 1. Linse (dem Objektiv) wird nach Unendlich abgebildet und von der 2. Linse in deren Brennebene, wo der Lichtdetektor positioniert wird, der die Bilder aufzeichnen kann. Da es sich hier um ein in der Fläche ausgedehntes Bild handelt, wird dies in der Regel der Detektor einer Kamera (im Folgenden Kamerachip genannt) sein. Wenn die Optik so ausgelegt ist, daß alle Punkte einer gewissen Fläche im Objekt gleichzeitig abgebildet werden können und deren Licht detektiert werden kann, nennt man dies Weitfelddetektion; zusammen mit einer flächigen Ausleuchtung ergibt sich das Weitfeldmikroskop im Gegensatz z.B. zum Laserscanning-Mikroskop, wo nicht gleichzeitig flächig beleuchtet und detektiert wird. Der Kamerachip kann nur ein zweidimensionales Bild aufzeichnen, d.h. nur die Brennebene des Objektivs wird scharf auf den Kamerachip abgebildet; das Bild aller anderen Ebenen liegt entweder vor oder hinter dem Kamerachip, denn die Strahlen der Objektpunkte außerhalb der Brennebene kreuzen sich vor oder hinter dem Kamerachip. Als Arbeitsabstand wird die Distanz vom vordersten Punkt des Objektivs bis zu der Ebene bezeichnet, die scharf auf den Detektor abgebildet wird und hier durch die Brennebene gegeben ist.

Eine wichtige Eigenschaft des Mikroskops ist die *Vergrößerung M*. Zwei Punkte in der Objektebene, die den Abstand d haben, besitzen in der Bildebene den Abstand d * M mit

$$M = \frac{f_2}{f_1},$$
 (2.1)

wobei f_1 die Brennweite des Objektivs und f_2 die Brennweite der 2. Linse ist.

Als *Bildfeld* wird der Durchmesser des Bereichs im Objekt bezeichnet, der durch die Optik abgebildet werden kann. Es wird in der in Abbildung 2.1 gezeigten Anordnung zunächst am stärksten durch den Durchmesser der 2. Linse begrenzt. Die Kamera hat ebenfalls ein eigenes Bildfeld, und wenn der Durchmesser des Kamerachips kleiner als der Durchmesser des Bildes ist, begrenzt dies das detektierte Bild, so dass auch die Vergrösserung relevant ist: im Falle der Begrenzung durch den Kamerachip ist der Durchmesser des Bildfeld sind also Linsen mit großem Durchmesser und eine geringe Vergrößerung wichtig. Da gleichzeitig die Vergrößerung durch die Brennweite der Linsen bestimmt ist und auch der Durchmesser einer Linse bei gegebener Brennweite durch die begrenzte Brechkraft des Materials nicht beliebig groß gemacht werden kann, spielt das Verhältnis von Brennweite zu Linsendurchmesser (bzw. kleinster Blende in einem Linsensystem), die sogenannte *f-Zahl*, eine Rolle. Da im Tandem-Linsen-System die Aperturen der Linsen nicht aufeinander abgebildet sind, kann mit einer größeren f-Zahl bei vorgegebener Vergrößerung ein größeres Bildfeld erreicht werden.

Durch die f-Zahl ist eine weitere Bestimmungsgröße gegeben, die sogenannte numerische Apertur (NA) einer Linse

$$NA = n\sin\Theta, \qquad (2.2)$$

mit dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Linse und Objekt sowie dem halben Öffnungswinkel Θ des Lichtkegels, der noch von der Linse oder der kleinsten Apertur im Strahlengang eingefangen wird.

Durch Beugungseffekte bildet sich um jeden nach geometrischer Optik bestimmten Bildpunkt eine Beugungsfigur, die von der Form der Blenden im abbildenden System bestimmt ist. Um quantitativ zu erfassen, ob in den überlagerten Beugungsfiguren zweier benachbarter Bildpunkte noch zwei Punkte zu erkennen sind wird in der oft das Rayleighkriterium herangezogen. Dieses besagt, daß die Punkte dann unterscheidbar sind, wenn das Maximum der einen Beugungsfigur in das Minimum der anderen fällt. Typischerweise sind die Blenden kreisförmig, und in diesem Fall sind zwei Bildpunkte dann noch unterscheidbar, wenn ihr Abstand

$$d' = d * M = 1.22 \frac{\lambda}{NA} \tag{2.3}$$

beträgt, wobei λ die Wellenlänge des Lichts ist. d'heißt dann die laterale Auflösung des Mikroskops. Wenn die kleinste sensitive Einheit des Kamerachips, also ein Pixel, größer als d' ist, begrenzt die Pixelgröße die Auflösung.

In der Regel ist das abzubildende Objekt nicht selbstleuchtend, d.h. es muß beleuchtet werden. Dies kann prinzipiell in jeder Richtung geschehen, üblich ist die *Beleuchtung* durch das Objekt in das Mikroskop (Durchlichtbeleuchtung) oder auf das Objekt (Epi-Illumination), so daß reflektiertes oder auf eine andere Art angeregtes Licht detektiert wird. Abbildung 2.2 zeigt die Implementierung der Köhler-Beleuchtung (Koehler 1893). Die Lichtquelle wird durch die sogenannte Kondensorlinse in die rückwärtige Brennebene des Objektivs abgebildet und damit das Objekt homogen ausgeleuchtet, so daß im ganzen Bildfeld vergleichbare Anregungsbedingungen herrschen. Ein Strahlteiler lenkt das Licht in das Objektiv um.

Das Weitfeldmikroskop in der oben angeführten Realisierung, also das Tandem-Linsen-System, erfüllt eine Reihe von wünschenswerten Eigenschaften, die in der Einleitung für ein optisches System zur Abbildung funktioneller Signale im Gehirn gestellt wurden: es ermöglicht eine hohe Aufnahmegeschwindigkeit, die haupsächlich durch die Aufnahmegeschwindigkeit der Kamera gegeben ist, es können viele Objektpunkte gleichzeitig beobachtet werden, und es kann ein - im Vergleich zur möglichen Auflösung - großes Bildfeld erreicht werden.

Da das abgebildete Volumen dreidimensional ist, die Kamera jedoch nur zweidimensional detektiert, liefert diese Art der Weitfeldmikroskopie jedoch nur eingeschränkte Information über die Tiefe eines Signals. Zwar kann, wie noch gezeigt wird, auf Objektstrukturen, die ein gewisses Spektrum von lateralen räumlichen Frequenzen enthalten, scharf fokussiert werden, aber das Weitfeldbild enthält keine Information darüber, aus welchen Tiefen, also in der axialen Richtung, sich die Helligkeitsänderung auf einem Pixel zusammensetzt, wenn also keine zusätzliche Frequenzinformation vorliegt, wie dies auf einem einzelnen Pixel der Fall ist. Diese Information über die Tiefe von Signalen, optische Schnittbildung genannt, kann jedoch auch in die Weitfeldmikroskopie eingeführt werden.



Abbildung 2.1: Weitfeldmikroskop aus 2 Linsen bzw. Linsensystemen, axiale und laterale Richtung



Abbildung 2.2: Epi-Illumination mit Köhlerbeleuchtung.

2.2 Optische Schnittbildung durch strukturierte Beleuchtung

Einführung von optischer Schnittbildung in die Weitfeldmikroskopie heißt, eine zusätzliche Information in die Abbildung einzuführen, mit unterschieden werden kann, ob die Helligkeitsänderung auf einem Pixel aus einer bestimmten Tiefe (einem bestimmten Bereich um die Brennebene) kommt oder nicht. Dabei sollen die erwähnten Eigenschaften – hohe Aufnahmegeschwindigkeit, Parallelität der Aufnahme an vielen Stellen und großes Bildfeld – weitesgehend beibehalten werden.

Das Grundprinzip der strukturierten Beleuchtung ist, einen schmalen Bereich um die Brennebene des Objektivs, dem Infokusbereich, durch ein dorthin abgebildetes Beleuchtungsmuster auszuzeichnen und die Signale dort in einer Amplitudenänderung dieses Musters zu kodieren. Der gesamte nicht-modulierte Objektbereich heißt Außerfokusbereich. Die Idee daß es möglich ist, das Beleuchtungsmuster auf einen engen Bereich in der axialen Richtung zu begrenzen basiert dabei auf der Beobachtung, wie die Amplitude lateraler räumlicher Frequenzen mit Abstand von der Brennebene, die scharf abgebildet wird, unterdrückt werden. Der Abstand von der Brennebene heißt Defokussierung. Es zeigt sich, daß nur die Nullfrequenz, die gleichmäßiger Helligkeit entspricht, mit zunehmender Defokussierung nicht abgeschwächt wird, alle anderen jedoch werden abgeschwächt. Auf eine unendlich ausgedehnte, gleichmäßig helle Fläche kann nicht fokussiert werden. Dies wird weiter unten mit den Methoden der Fourier-Optik ausführlicher erläutert.

Das Beleuchtungsmuster in dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Aufbau wird erzeugt, indem ein Strichgitter in die Brennebene des Objektivs abgebildet wird (Abbildung 2.3). Das Strichgitter besteht aus parallelen Streifen, die entweder nahezu 100 % bzw. 0% Transmission haben, eine sogenannte Ronchi-Gitter (engl. ronchi ruling), so daß das Gitter in Transmission beleuchtet werden kann. Wenn nun das Bild des Gitters bewegt wird, z.B. durch Verschiebung des Gitters selber, wird das Anregungslicht in dem Bereich des Objekts moduliert beleuchtet, in dem das Bild des Gitters nicht unterdrückt ist. Eine Signal (eine Helligkeitsänderung des detektierten Lichts) aus diesem Bereich trägt dann ebenfalls diese Modulation (im Folgenden Außerfokus-Signal genannt), Signale mit anderem Ursprungsort nicht (im Folgenden Außerfokus-Signal genannt), siehe Abbildung 2.4. Damit kann zwischen Infokus- und Außerfokus-Signal eindeutig unterschieden werden: das erstere ist in einer Amplitudenänderung der Modulation. Beide Signale werden immer noch gleichzeitig detektiert und müssen dann nachträglich getrennt werden. Wie dies möglich ist wird in Abschnitt 2.2.2 und 3.2.2 erläutert.



Abbildung 2.3: Die strukturierte Beleuchtung wird durch Abbildung eines Strichgitters in die Brennebene des Objektivs erzeugt. K:Kondensor, O: Objektiv



Abbildung 2.4: Das Infokus-Signal ist amplitudenmoduliert, das Außerfokus-Signal nicht. In beiden Fällen ändert sich jedoch der Mittelwert, der dem Intensitätsverlauf entspricht, den die Signale ohne strukturierte Beleuchtung erzeugen würden. Ohne die Modulation durch strukturierte Beleuchtung sind Infokus- und Außerfokussignal auf einem Pixel also nicht unterscheidbar, mit strukturierter Beleuchtung sind sie es.

2.2.1 Die optische Transferfunktion

Für die optische Schnittbildung und, wie später gezeigt wird, auch für die die Signalstärke in den Infokus-Bildern ist die dreidimensionale Intensitätsverteilung des Gitterbildes im Objekt entscheidend. Um diese zu bestimmen soll nun das Konzept der optischen Transferfunktion beschrieben werden.

Die optische Transferfunktion beschreibt zunächst den Einfluß von Beugungseffekten auf die Amplituden- und Phasenänderung von räumlichen Frequenzen bei der Abbildung in linearen optischen Systemen. Auch Effekte wie eine diskrete Abtastung des Bildes können in diesem Konzept gefaßt werden. Hier wird zuerst die Auswirkung der Beugung beschrieben. Außerdem sei zuerst die Abbildung auf eine einzige Ebene betrachtet, die dritte Dimension wird später hinzugefügt.

Sei f(x, y) die Helligkeitsverteilung im Objekt und g(X, Y) die im Bild. Die Wirkung des optischen Systems wird durch einen linearen und translationsinvarianten Operator Abeschrieben:

$$g(X,Y) = \Lambda\{f(x,y)\}$$
(2.4)

Nun wird f(x, y) als Faltung mit der Dirac'schen δ -Distribution ausgedrückt und Λ in das Faltungsintegral gezogen:

$$g(X,Y) = \int_{-\infty}^{\infty} dx' \int_{-\infty}^{\infty} dy' f(x',y') \Lambda \left\{ \delta(x'-x) \delta(y'-y) \right\}$$
(2.5)

Der Ausdruck $\Lambda\{\delta(x'-x)\delta(y'-y)\}$ wird als Impulsantwort des Sytems bezeichnet. Dieser Begriff umfaßt auch die sogenannte Punktbildfunktion; da aber dieser Begriff in der Literatur nicht immer einheitlich gebraucht wird, wird hier durchgängig von der Impulsantwort gesprochen. Die Impulsantwort beschreibt, wie ein Punkt in der Objektebene in der Bildebene abgebildet wird. Die Helligkeitsverteilung im Bild kann also als Faltung der Helligkeitsverteilung im Objekt mit der Impulsantwort beschrieben werden:

$$g = f \otimes \Lambda \,, \tag{2.6}$$

⊗ bezeichnet den Faltungsoperator. Die Gleichung (2.6) bekommt nach Fouriertransformation im Frequenzraum eine einfachere Gestalt:

$$F(g) = F(f) * F(\Lambda), \qquad (2.7)$$

die Faltung wird zur Multiplikation. $F(\Lambda)$ heißt Transferfunktion. Ihr Betrag heißt Modulationstransferfunktion (MTF) und beschreibt, wie die Amplitude räumlicher Objektfrequenzen in das Bild übertragen werden, ihre Phase leistet das gleiche für die räumlichen Phasen und heißt daher Phasentransferfunktion.

In (Goodman 1996) wird beschrieben, wie mit Hilfe der Beugungstheorie die optische Transferfunktion berechnet werden kann. In einem optischen System kann die Lichtausbreitung durch den Durchmesser der Linsen bestimmt sein oder durch eine andere physikalische Blende. Diese wird Aperturblende genannt. In Abbildung 2.5 ist die Geometrie bei der Abbildung an einer Linse gezeigt. Die Transferfunktion ist dort die Apertur selber

$$F(\Lambda) = \tilde{\Lambda}_{koh}(f_x, f_y) = P(\lambda z_2 f_x, \lambda z_2 f_y), \qquad (2.8)$$

wobei die Ortskoordinaten (x, y) in der Aperturblende auf Frequenzkoordinaten (f_x, f_y) umgeschrieben wurden und $\tilde{\Lambda}$ die Fouriertransformierte von Λ ist. Dies gilt im Fall der Abbildung mit kohärentem Licht, wo sich die Feld*amplituden* addieren. Daher

wird die mit der Apertur identische Transferfunktion auch als kohärente Transferfunktion oder Amplitudentransferfunktion bezeichnet.



Abbildung 2.5: Geometrie der Beugung an einer Linse. Das Feld U_0 propagiert bis zur Linse, an deren Apertur es gebeugt wird und dann weiter bis zur Bildebene propagiert, wo es die Gestalt U_i hat. Abbildung aus (Goodman 1996).

Bei einer Abbildung mit inkohärentem Licht überlagern sich nicht die Amplituden, sondern die Intensitäten, also das Quadrat der Amplitude. Die Impulsantwort wird dann auch quadriert, und die Transferfunktion kann über das Plancherel-Theorem (Duffieux 1983) berechnet werden:

$$\widetilde{\Lambda}_{inkoh}(f_x, f_y) = \int_{-\infty}^{\infty} dx \int_{-\infty}^{\infty} dy P(x + \frac{\lambda z_2 f_x}{2}, y + \frac{\lambda z_2 f_y}{2}) P^*(x - \frac{\lambda z_2 f_x}{2}, y - \frac{\lambda z_2 f_y}{2}).$$
(2.9)

Die inkohärenten Transferfunktion, auch *optische Transferfunktion* (OTF) genannt, ist die *Autokorrelation der Apertur*. Da sie unmittelbar angibt, wie räumliche Frequenzen bei der Abbildung abgeschwächt werden, und weil zumindest die Detektion, im Rahmen dieser Arbeit aber auch die Anregung mit inkohärentem Licht gemacht wird, ist sie die geeignete Beschreibung für die Abbildung des Gitters bei der strukturierten Beleuchtung. Anschaulich ist die OTF der Überlapp zwischen zwei geometrischen Figuren der Form *P* der Apertur (Pupille), die um die Distanz $\lambda z_2 f_{x,y}$ voneinander getrennt sind. Division durch

$$\int_{-\infty}^{\infty} dx \int_{-\infty}^{\infty} dy \ P(x, y)$$
(2.10)

ergibt die normierte OTF.

In Abbildung 2.6 ist der Betrag der OTF, die MTF, noch einmal anschaulich gemacht. Im Ortsraum betrachtet läßt die Faltung des Gitters mit der Impulsantwort bei der Abbildung einen Teil des Lichts aus den hellen Streifen in die dunklen. Wenn dann die Gitterstreifen enger werden, also im Frequenzraum die Gitterfrequenz höher, wird die Modulationsamplitude geringer. Es gibt eine endliche Grenzfrequenz, ab der alle Objektfrequenzen im Bild die Modulationsamplitude 0 haben; diese Grenzfrequenz kann ebenfalls als Aulösungsgrenze des Mikroskops verwendet werden. Weiter unten wird die OTF für eine kreisförmige Apertur explizit angegeben.



Abbildung 2.6: Konzept der Modulationstransferfunktion für die Amplitude. Die Modulationsamplitude wird durch Beugungseffekte reduziert. Je schmaler die Streifen werden, umso stärker wirkt sich die Beugung aus und die Modulationsamplitude sinkt. Bild aus http://www.microscopyu.com

Nun soll noch gezeigt werden, wie die OTF in der axialen (z-) Richtung berechnet werden kann, wofür nicht nur die Beugung relevant ist. Ein bestimmter axialer Abstand eines Punktes von der Bildebene wurde oben als Defokussierung bezeichnet. Bisher wurde angenommen, daß die von der Ausgangspupille des optischen Systems auslaufende Welle eine auf einen Punkt in der Bildebene zusammenlaufende sphärische Wellenfront hat. Bei einer Defokussierung, wo eine Ebene betrachtet wird, die nicht die Bildebene ist, ist dies nicht mehr gegeben, d.h. die auslaufende Wellenfront ist auf einen Punkt außerhalb der Bildebene zentriert (Abbildung 2.7). Die Defokussierung kann durch einen Pfadlängenunterschied w der geometrischen Strahlen ausgedrückt werden. Dies führt zu einem zusätzlichen Phasenterm in der Transmission der Pupille

$$\wp = P e^{ikw(x,y)} \tag{2.11}$$

Wenn $A(f_x, f_y)$ der Überlapp zwischen den Pupillenfunktionen in (2.9) ist, ergibt sich die OTF mit Defokussierung zu

$$\widetilde{\Lambda}(f_x, f_y) = \iint_{A(f_x, f_y)} e^{ik \left[w(x + \frac{\lambda z_2 f_x}{2}, y + \frac{\lambda z_2 f_y}{2}) - w(x - \frac{\lambda z_2 f_x}{2}, y - \frac{\lambda z_2 f_y}{2})\right]} dx \, dy \,, \tag{2.12}$$

wo nur noch über den Überlapp der Pupillenfunktionen bei einem gegebenen (f_x, f_y) integriert wird.

Für die Defokussierung ist

$$w(x,y) = -\frac{1}{2} \left(\frac{1}{z_P} - \frac{1}{z_2} \right) (x^2 + y^2) .$$
(2.13)

Damit kann auch die OTF außerhalb der Bildebene berechnet werden.



Abbildung 2.7: Die auslaufende Wellenfront S'_1 läuftt in einem Außerfokuspunkt P zusammen. Ein Lichtstrahl darin hat einen Pfadlängenunterschied w zu der Wellenfront S', die in den Infokuspunkt I zusammenläuft. Abbildung aus (Stockseth 1969).

Die OTF soll nun für eine kreisförmige Pupille mit Radius r angegeben werden, die typischerweise in optischen Systemen und auch im später beschriebene Aufbau gegeben ist. Sie ist in der Bildebene der Überlapp zweier Kreise, deren Mittelpunkte den Abstand

 ρ (was den Frequenzen f_x und f_y entspricht) haben und ist gegeben durch (Goodman 1996)

$$\widetilde{\Lambda}(\rho) = \begin{cases} \frac{2}{\pi} \left[\arccos\left(\frac{\rho}{2\rho_0}\right) - \frac{\rho}{2\rho_0} \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{2\rho_0}\right)^2} \right] & \text{für } \rho \le 2\rho_0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$
(2.14)

mit

$$\rho_0 = \frac{r}{\lambda z_2},\tag{2.15}$$

der Grenzfrequenz der Auflösung bei kohärenter Abbildung. Im inkohärenten Fall ist die Grenzfrequenz also doppelt so groß wie im kohärenten. Die OTF außerhalb der Bildebene ist (Hopkins 1955), zitiert nach (Stockseth 1969):

$$\widetilde{\Lambda}(s) = \frac{4}{\pi a} \cos\left(\frac{1}{2}as\right) * \left\{\beta J_{1}(a) + \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^{n+1} \frac{\sin 2n\beta}{2n} [J_{2n-1}(a) - J_{2n+1}(a)]\right\}$$

$$-\frac{4}{\pi a} \sin\left(\frac{1}{2}as\right) \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^{n} \frac{\sin(2n+1)\beta}{2n+1} [J_{2n}(a) - J_{2(n+1)}(a)]$$
(2.16)

mit

$$a = \frac{4\pi}{\lambda} ws$$

$$\beta = \cos^{-1}\left(\frac{s}{2}\right)$$

$$s = \frac{\lambda}{NA} f$$
(2.17)

wobei J_n die Besselfunktion der ersten Art, Ordnung *n* ist und *f* die räumliche Frequenz im Objekt.

Für diese Gleichung ist in (Stockseth 1969) eine Näherungslösung angegeben, die für $w \ge 5\lambda$ am Rand der Aperturblende, was in allen Messungen im Rahmen dieser Arbeit immer erfüllt ist, den exakten Ausdruck sehr gut annähert:

$$\widetilde{\Lambda}(w,s) = 2(1-0.69s+0.0076s^2+0.043s^3) \left[\frac{J_1(a-\frac{1}{2}as)}{a-\frac{1}{2}as} \right]$$
(2.18)

Abbildung 2.8 zeigt die dreidimensionale MTF bei kreisförmiger Pupille, wobei auf der nach vorne zeigenden Achse eine laterale Frequenz und auf der seitlichen Achse die Defokussierung aufgetragen ist. Sowohl mit zunehmender Frequenz als auch mit zunehmender Defokussierung wird die Amplitude von Objektfrequenzen, die größer als 0 sind, abgeschwächt. Diesen Effekt nutzt man bei der optischen Schnittbildung in der Weitfeldmikroskopie, indem die Infokussignale in der Amplitude einer bestimmten räumlichen Frequenz in der Beleuchtung, die dann eben mit zunehmender Defokussierung unterdrückt wird, kodiert werden. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist von Bedeutung, daß die Amplitude verschiedener Frequenzen unterschiedlich stark abgeschwächt wird, so daß durch die Wahl der Frequenz unterschiedliche Schnittbreiten erreicht werden können, und daß auch schon die Amplitude geringer Frequenzen rasch mit zunehmender Defokussierung abgeschwächt wird, denn bei geringen Frequenzen hat die MTF ohne Defokussierung einen hohen Wert, und es wird später gezeigt, daß eine große Modulationsamplitude wichtig für ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis ist.



Abbildung 2.8: 3D-OTF. Die Modulationstransmission T ist gegen die Frequenz ω und die Defokussierung ξ aufgetragen. Auch für kleine Frequenzen wird die Modulationsamplitude mit Defokussierung schnell abgeschwächt. Abbildung aus (Steel 1956).

Die dreidimensionale OTF hat vollständig in Frequenzkoordinaten gezeichnet die Gestalt wie in Abbildung 2.9 oben gezeigt, siehe z.B. (Erhardt, Zinser et al. 1985). Hier geht eine als axialsymmetrisch angenommene Apertur ein, so daß die OTF auch

rotationssymmetrisch um die z-Achse ist. Die laterale Nullfrequenz hat bei Defokussierung konstante Amplitude, hat also auch in z-Richtung die Nullfrequenz, d.h. keine Abschwächung. Die Tatsache, daß die Nullfrequenz, die einem homogen leuchtenden Objekt entspricht, bei Defokussierung konstante Amplitude hat, wird als "missing cone" Problem der Weitfeldmikroskopie bezeichnet, diese Bezeichnung wird an dem fehlenden Kegel mit der Spitze bei $k_{x,y} = 0$ in Abbildung 2.9 deutlich. Durch die zusätzliche Abbildung des Gitters mit der Frequenz ω_G enthält das Objekt, das zuvor Frequenzen bei ω_0^{i} hatte, nun die Frequenzen bei $\omega_0^{i} \pm \omega_G$, das Frequenzspektrum wird also um ω_{G} verschoben, die Objektfrequenzen werden zu Seitenbandfrequenzen um die Gitterfrequenz. Dadurch werden Frequenzen, die zuvor nicht auflösbar waren, in den Bereich geschoben, in dem die OTF von Null verschieden ist. In der Darstellung der OTF kann dies so ausgedrückt werden, daß bei $\pm \omega_G$ die konventionelle Weitfeld-OTF dupliziert wird. Dies ist in Abbildung 2.9 gezeigt. Der "fehlende Kegel" ist dadurch teilweise gefüllt. An diesem Bild kann ebenso wie an Abbildung 2.8 deutlich gemacht werden, daß durch die Einführung des Beleuchtungsmusters optische Schnittbildung in der Weitfeldmikroskopie möglich wird. Optische Schnittbildung bedeutet damit, daß den Signalen selbst durch die Art der Anregung ihr räumlicher Ursprung gewissermaßen "eingeprägt" ist, nämlich dort, wohin das Gitter abgebildet ist.

Aus der bisherigen Darstellung wird deutlich, daß natürlich auch die Amplitude jeder Objektfrequenz größer Null bis zur Auflösungsgrenze, die durch die Struktur des Objekts selbst entsteht, mit Defokussierung abnimmt. Da das Objekt selbst dreidimensional ist aber nur zweidimensional detektiert wird, kann die Intensitätsverteilung (nicht das Frequenzspektrum) im *Bild* eine Überlagerung aus verschiedenen Tiefen sein und nicht eindeutig auf eine bestimmte axiale Position zurückgeführt werden. Das wird durch die Messungen in Abschnitt 4.3 und 5.1 gezeigt. Dies ist dann möglich, wenn diese Information schon im dreidimensionalen Objekt erzeugt wird wie z.B. durch die auf eine bestimmte Tiefe beschränkte Beleuchtungsstruktur.

Die Art der Detektion bedingt jedoch, daß Infokus- und Außerfokussignale zusammen in einem Bild aufgenommen werden. Das Infokussignal muß also noch aus dem Bild mit strukturierter Beleuchtung extrahiert werden.



Abbildung 2.9: Graphik einer 3D OTF in Frequenzkoordinaten, Auswirkung der Modulation mit der Gitterfrequenz (Pfeil)

2.2.2 Konventionelle Extraktion des Infokussignals

Für die Erfordernisse im Rahmen dieser Arbeit wurde ein eigener Algorithmus zur Extraktion des Infokussignals aus den Bildern mit strukturierter Beleuchtung entwickelt. Dieser wird in einem späteren Kapitel erläutert. An dieser Stelle soll der Algorithmus beschrieben werden, der in der ersten Publikation zur optischen Schnittbildung mit strukturierter Beleuchtung (Neil, Juskaitis et al. 1997) vorgestellt wurde. Die Darstellung folgt im Wesentlichen (Wilson and Karadaglic 2000).

Das Bild I(x, y) auf dem Detektor kann in komplexer Notation in drei Komponenten zerlegt werden:

$$I_{n}(x, y) = I_{0}(x, y) + \alpha(x, y) \exp[i\varphi_{n}]I_{v}(x, y) + \alpha(x, y) \exp[-i\varphi_{n}]I_{-v}(x, y)$$
(2.19)

Der erste Summand entspricht dem gewöhnlichen Weitfeldbild ohne strukturierte Beleuchtung, die beiden anderen dem Infokuslicht, wobei die Modulation durch das Gitter mit Amplitude α mit komplexen Exponentialfunktionen geschrieben wird und so zwei Komponenten mit umgekehrten Vorzeichen in der Frequenz ν entstehen, die zusammen wieder eine reellwertige Modulationsfunktion ergeben. Die jeweilige Phase der Gitterposition ist φ_n . Da ein Signal in einer Änderung der Gitteramplitude kodiert ist, bedeutet optische Schnittbildung die Berechnung der Amplitude α aus dem Bild I_n . Die Variablen in (2.19) sind φ_n und $\alpha I_{\pm \nu}$. Wenn also drei Bilder mit verschiedenen φ_n aufgenommen werden, kann ein eindeutig lösbares Gleichungssystem aufgestellt werden, mit dem $|\alpha I_{\pm \nu}|$, die lokale Modulationsamplitude in diesen Bildern, an jeder Stelle (x, y), also jedem Pixel des Kamerachips, berechnet werden kann.

Für $\varphi_{1,2,3} = \left\{0, \frac{2\pi}{3}, \frac{4\pi}{3}\right\}$ hat die Lösung eine sehr einfache Form:

$$I_0 = \frac{1}{3} \left(I_1 + I_2 + I_3 \right) \tag{2.20}$$

und

$$\left|\alpha I_{\nu}\right| = \left|\frac{2}{3}\left(I_{1} + I_{2}e^{-i2\pi/3} + I_{3}e^{i2\pi/3}\right)\right| = \frac{\sqrt{2}}{3}\sqrt{\left(I_{1} - I_{2}\right)^{2} + \left(I_{1} - I_{3}\right)^{2} + \left(I_{2} - I_{3}\right)^{2}}$$
(2.21)

Gl. (2.20) wird im Folgenden als "Summenalgorithmus" zitiert und Gl. (2.21) als "Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997)". Der Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) wurde bereits in verschiedenen Anwendung benutzt, um die Infokus-Bilder zu berechnen, z.B. bei der Aufnahme eines fluoreszenzmarkierten Actin-Cytoskeletts (Lanni and Wilson 2000), in Fibroblasten, die ein fluoreszentes Protein (GFP) exprimieren (Lagerholm, Vanni et al. 2003), bei der Messung der Fluoreszenzlebensdauer (FLIM) von Farbstoffen und Autofluoreszenz in präpariertem und lebendem Gewebe(Cole, Siegel et al. 2001; Elson, Siegel et al. 2002) sowie in fluoreszenten Mikrokugeln (Webb, Gu et al. 2002), außerdem in einem medizinischen Endoskop (Karadaglic, Juskaitis et al. 2002).

Wenn allerdings die relativen Phasen der Gitterpositionen von den $2\pi/3$ -Schritten abweichen wird sowohl das Bild ohne als auch das mit optischer Schnittbildung durch diese Formeln nicht korrekt reproduziert. Dies wird in (Wilson and Karadaglic 2000) nicht diskutiert, und in (Cole, Siegel et al. 2001) ist eine fehlerhafte Korrektur für das Infokus-Bild angegeben, daher wird hier die jeweils korrigierte Form wiedergegeben, die im Anschluß an (Wilson and Karadaglic 2000) selbst berechnet wurden. Im Fall beliebiger Phasen muß von (2.20) noch

$$\frac{(I_1 + I_2 - 2I_3)\sin(\varphi_1 - \varphi_2) - (I_1 + I_3 - 2I_2)\sin(\varphi_1 - \varphi_3)}{\sin(\varphi_1 - \varphi_2) - \sin(\varphi_1 - \varphi_3) + \sin(\varphi_2 - \varphi_3)} + \frac{(I_2 + I_3 - 2I_1)\sin(\varphi_2 - \varphi_3)}{\sin(\varphi_1 - \varphi_2) - \sin(\varphi_1 - \varphi_3) + \sin(\varphi_2 - \varphi_3)}$$
(2.22)

abgezogen werden und die allgemeine Form von (2.21) lautet

$$\frac{\exp(i\varphi_3)(I_1 - I_2) + \exp(i\varphi_1)(I_2 - I_3) + \exp(i\varphi_2)(I_3 - I_1)}{(\exp(i\varphi_2) - \exp(i\varphi_1))(\exp(i\varphi_3) - \exp(i\varphi_1))(\exp(i\varphi_3) - \exp(i\varphi_2))}$$
(2.23)

2.2.3 Laterale Auflösungsverbesserung durch strukturierte Beleuchtung

In Abbildung 2.9 wird eine weitere Auswirkung der strukturierten Beleuchtung deutlich: der Frequenzbereich, in dem die OTF größer als Null ist, wird zu höheren Frequenzen hin ausgedehnt, die laterale Auflösung also verbessert. Damit die laterale Auflösungsverbesserung sich bemerkbar macht, darf die Gitterfrequenz nicht zu klein gegen die Auflösungsgrenzfrequenz sein. In der hier gewählten Implementierung der strukturierten Beleuchtung für die funktionelle Hirnabbildung wurde die Gitterfrequenz im Objekt so gewählt (18,6 mm⁻¹), daß die optische Schnittdicke ca. 90 μ m ist. Die Auflösungsgrenzfrequenz ist ca. 2 μ m⁻¹. Die Gitterfrequenz ist also sehr viel kleiner als die Auflösungsgrenzfrequenz, so daß sich die laterale Auflösungsverbesserung hier nicht bemerkbar macht.

2.3 Optische Schnittbildung in biologischem Gewebe

In Kapitel 2 wurde das zu untersuchende Objekt beschrieben: wie das Gehirn aufgebaut ist und wie Signale mit sichtbarem Licht darin erzeugt werden können, die mit der Funktion des Gehirns verbunden sind. Diese Signale werden im folgenden funktionelle Signale genannt. Nachdem bisher in diesem Kapitel das Prinzip der Weitfeldmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung dargelegt wurde, soll dieser Abschnitt zur Anwendung überleiten, indem Größen und Begriffe eingeführt werden, die für die Mikroskopie am Gehirn und speziell für die mit strukturierter Beleuchtung grundlegend sind. Dabei soll vor allem deutlich gemacht werden, welche Randbedingungen und Einschränkungen sich durch die besonderen Eigenschaften des Gehirns und der Art der darin erzeugten funktionellen Signale ergeben. Auch die Beschreibung des Meßaufbaus wird damit vorbereitet.

Zunächst einmal ist das Ziel, am lebenden, vollständig intakten Gehirn, also *in vivo* messen zu können. Dies bedeutet, das Gehirn wird im Schädel belassen und nur der zu beobachtende Teil des Gehirns freigelegt. Durch die notwendige Fixierung des Tieres,

die im Kapitel über die Meßergebnisse beschrieben ist, bleibt für die Beleuchtung dann nur die Möglichkeit der Epiillumination. Damit ist die Geometrie wie in Abbildung 2.2 vorgegeben, die mit sich bringt, daß antiparallel zur optischen Achse der Anregung detektiert wird; zumindest kann von dieser Geometrie nicht wesentlich abgewichen werden. Dies macht die optische Schnittbildung für die Tiefenauflösung der Signale notwendig, denn die Signale können in dieser Geometrie prinzipiell überall entlang und parallel zur Detektionsachse angeregt werden. Mit der Epiillumination läßt sich auch relativ einfach eine recht homogene laterale Beleuchtung erreichen, so daß im ganzen Bildfeld gleiche Anregungsintensität zur Verfügung steht.

wichtige Eigenschaft eines funktionellen Signals Eine ist die relative Helligkeitsänderung des detektierten Lichts, die es verursacht. Da das detektierte Licht oft (aber nicht notwendigerweise) Fluoreszenz ist, wird die Helligkeit vor der Stimulation mit F bezeichnet, die absolute Helligkeitsänderung während der Antwort mit ΔF . Die relative Helligkeitsänderung ist dann $\Delta F/F$, es wird üblicherweise in % angegeben. Das $\Delta F/F$ von Lichtsignalen im Gehirn kann in einem Bereich von 0.01% (z.B. bei den intrinsischen Signalen) bis über 100% (z.B. bei fluoreszenten Kalziumindikatoren) liegen.

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist das Signal-zu-Rausch Verhältnis (engl. signal-tonoise ratio, SNR). Es bezeichnet den Quotienten aus der absoluten Helligkeitsänderung ΔF des funktionellen Signals und und der Standardabweichung R aller zufälligen (nicht systematischen) Helligkeitsänderungen, die gleichzeitig detektiert werden: SNR = $\Delta F/R$. Wenn SNR > 1 ist, ist das Signal in der zeitlichen Folge der Meßwerte zu sehen, wenn $SNR \le 1$ ist, kann das Signal durch Mitteln in wiederholten Messungen sichtbar gemacht werden, falls es in allen Messungen die gleiche oder zumindest eine ähnliche zeitliche Form hat. Eine Rauschquelle, die immer vorhanden ist, ist die zeitliche Fluktuation detektierter Photonen, die auch bei konstanter mittlerer Intensität durch die statistische Natur des Lichtemissionsprozesses bedingt ist. Dieses Rauschen wird Schrotrauschen genannt. In den elektronischen Komponenten, die das detektierte Bild verarbeiten, unterliegen die elektrischen Ströme ebenfalls Schwankungen, die z.B. thermisch bedingt sein können. Die Summe des Rauschens aller elektronischen Verarbeitungskomponenten wird Dunkelrauschen genannt, da es auch vorhanden ist, wenn kein Licht auf den Detektor fällt; falls es in der Elektronik auch noch Verstärkungsstufen gibt, kann es auch sogenanntes multiplikatives Rauschen geben. Die zeitliche Variation dieser beiden Rauscharten findet auf einer Zeitskala statt, die wesentlich kürzer als die von funktionellen Signalen und der Bildwiederholrate der üblicherweise verwendendeten Kameras ist, die nicht wesentlich unter 1 ms liegt. Auch die räumliche Variation des Schrotrauschens ist auf einer deutlich kleineren Skala als die der funktionellen Signale oder einer Pixelgröße. Bei konstanter Intensität kann dieses Rauschen also als homogen angesehen werden und wegen seiner stochastischen Natur durch Mitteln reduziert werden. Zu diesen beiden Rauschquellen können Helligkeitsschwankungen hinzukommen, die nicht von funktioneller Aktivität herrühren und auch nicht stochastischer Natur sind, die aber trotzdem oft als biologisches Rauschen bezeichnet werden; die Bezeichnung biologische Artefakte wäre zumindest auch angemessen. Eine Quelle dafür ist eine Änderung in der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins im Blut, die zu ausgedehnten langsamen Absorptionsänderungen des Anregungslichts führen kann. Ein solcher Prozess kann auch auf einen äußeren Reiz hin erfolgen und dann ein funktionelles Signal sein. Anderer Artefaktquellen sind Bewegungen des Gehirns durch Pulsieren des Blutes in den Gefäßen aufgrund des Herzschlags oder durch die Atmung. Diese Änderungen finden z.B. in Mäusen auf einer Zeitskala von wenigen Hz statt und sind dann langsamer als viele funktionelle Signale. Sie können in wiederholten Messungen so ähnlich sein, daß sie durch Mitteln nicht zu beseitigen sind.

Das ΔF und das Rauschen "konkurrieren" also bei der Sichtbarkeit des Signals. Das ΔF wächst linear mit der Intensität, und wenn das Schrotrauschen als Rauschquelle dominiert, das mit \sqrt{F} steigt (siehe Kapitel 4), kann das Signal-zu-Rausch Verhältnis durch Steigerung der Anregungsintensität verbessert werden, solange die Kamera nicht saturiert wird und das Anregungslicht nicht zu Bleichen oder Gewebeschäden führt. Daher wird eine Messung im Schrotrauschbereich angestrebt.

Das ΔF bei einer Messung mit strukturierter Beleuchtung skaliert nun nicht mit der Fluoreszenzintensität F aus der ganzen Probe, sondern mit der Modulationsamplitude. Das Signal ist ja in der Amplitude kodiert, und ist damit nicht die Intensitätsänderung in den hellen Streifen, sondern in der Differenz zwischen hellen und dunklen Streifen. Das Rauschen stammt aber immer noch vom gesamten detektierten Licht. Da das Schrotrauschen intensitätsabhängig ist, ändert es sich auch während der Modulation etwas. Als mittleres Rauschen kann das Schrotrauschen beim Mittelwert der Modulation angenommen werden. Wenn als relative Modulationsamplitude der Quotient aus Modulationsamplitude und Maximalwert der Modulation definiert wird, ändert sich das Signal-zu-Rausch Verhältnis durch die relative Modulationsamplitude und ebenso um $\sqrt{F/F_{mittel}}$ gegen das oben für gewöhnliche Weitfeld-Bildgebung definierte: $SNR_{strukt.Bel.} = SNR(F_{mittel}) * MA_{rel} = \frac{\Delta F}{\sqrt{F_{mittel}}} MA_{rel}$. Für die im Hirngewebe

gemessenen Modulationsamplituden (Kapitel 4 und 5) ist dies immer deutlich schlechter als das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei gewöhnlicher Weitfeldbeleuchtung.

Im Hirngewebe kommen nun noch zwei Effekte hinzu. Das Außerfokuslicht erhöht den Mittelwert der Modulation, also nur das Rauschen, nicht aber die Signalstärke. Wenn z.B. die Fluoreszenz aus einem weiten Außerfokusbereich kommt oder der Farbstoff dort höher konzentriert ist als im Infokusbereich, kann diese Mittelwerterhöhung deutlich größer als die Modulationsamplitude sein. Außerdem ist das Hirngewebe ein stark streuendes Medium. Dadurch wird das Licht, das das Gitter in einer gewissen Eindringtiefe bildet, reduziert; ebenso vermindert die Streuung bei der Detektion die Anzahl der Photonen, die auf der Kamera das Bild des Gitters formen. Sowohl durch Außerfokuslicht als auch durch Streuung wird also im Gehirn das Signal-zu-Rausch Verhältnis verschlechtert. Im Anschluß an die Messung in Hirngewebe wird ein Modell

für das Signal-zu-Rausch Verhältnis bei optischer Schnittbildung durch strukturierte Beleuchtung entwickelt, das die oben diskutierten Einflüsse quantitativ erfaßt.

Das bisher in diesem Abschnitt Gesagte ist bei der Anwendung der strukturierten Beleuchtung im Gehirn zu beachten. Welche Vorteile sind nun von der Schnittbildung durch strukturierte Beleuchtung zu erwarten? In der Einleitung wurde schon erwähnt, daß diese Methode auf die Untersuchung neuronaler Signalverarbeitung im Gehirn auf einer "mittleren" Auflösungebene abzielt. Dies soll nun auch genauer eingeordnet werden.

Der ganz grundlegende Vorteil von optischer Schnittbildung im Gehirn ist, daß dadurch funktionelle Signale in einer bestimmten Tiefe lokalisiert bzw. als solche überhaupt erst sichtbar gemacht werden können. Abbildung 2.9 zeigt, daß mit der strukturierten Beleuchtung erreicht werden kann, daß im Schnittbild die Amplitude aller lateralen Frequenzen der Helligkeitsstruktur eines Objektes bis zur Auflösungsgrenze mit Defokussierung unterdrückt wird. Wenn also bekannt ist, wie die Amplitude der Modulation mit Defokussierung abgeschwächt wird, ist bei allen funktionellen Signalen im Schnittbild bekannt, aus welchem Bereich um die Bildebene des Objektivs sie stammen, denn sie wurden ja aus der Amplitude der Modulation gewonnen. Die Modulationsfrequenz ergibt sich durch die angestrebte Schnittdicke, und die Pixelgröße der Kamera wurde so gewählt, daß die Gitterfrequenz mehr als zwei mal pro Periode abgetastet wird. Gleichzeitig stellen die Pixel die Auflösungsgrenze im Bild dar, es können keine Frequenzen, deren Periode weniger als 2 Pixel umfaßt, detektiert werden (Lanni and Baxter 1992). Es wird durch die strukturierte Beleuchtung damit für die meisten Objektfrequenzen erreicht, daß sie genauer als im gewöhnlichen Weitfeldbild lokalisiert werden können. Soweit zum Vorteil der Tiefendiskriminierung.

Auch wenn die Amplitude einer Reihe von Objektfrequenzen auch im gewöhnlichen Weitfeldmikroskop bei Defokussierung schon unterdrückt wird, so fällt das Licht dieser Teile des Objekts doch immer noch auf die Kamera und überlagert das Infokusbild. Ein funktionelles Signal im Kamerabild kann also die Summe von funktionellen Signalen aus sehr verschiedenen Tiefen sein. Der Zeitverlauf, der auf der Kamera detektiert wird, kann dann keinem bestimmten Ort mehr zugeordnet werden, oder anders gesagt, der Zeitverlauf gibt nicht den einer bestimmten funktionellen Einheit wieder, der aber eigentlich untersucht werden soll. Gerade der Zeitverlauf ist aber neben der Signalstärke und dem Signalort eine der wesentlichen Informationen, anhand derer die Signalverarbeitung im Gehirn untersucht werden kann.

Durch das Rauschen ist diese Limitation stets gegeben. Bei einer hohen räumlichen Auflösung (durch kleine Pixel oder eine hohe Vergrößerung) ist das Beobachtungsvolumen klein, so daß weniger Photonen detektiert werden. Damit wird schon bei einer schrotrauschbegrenzten Messung das Signal-zu-Rausch Verhältnis schlechter. Das Gehirn stellt in dieser Hinsicht ein besonders schwieriges Objekt dar. Kleine funktionelle Einheiten darin wie einzelne Neurone sind in der Regel mit ihren Axonen und Dendriten räumlich nicht getrennt, sondern durchdringen einander. Eine Einzelzellauflösung wurde aber hier auch nicht angestrebt, d.h. eine Mittelung funktioneller Signale im Beobachtungsvolumen wird ohnehin in Kauf genommen. Stattdessen wird eine Auflösung der Signale aus verschiedenen Hirnschichten angestrebt, so daß gleichzeitig die Zahl der detektierten Photonen wesentlich höher ist, was für das Signal-zu-Rausch Verhältnis von Vorteil ist. Die Methode zielt also nicht auf maximale räumliche Auflösung, sondern darauf, bei einer mittleren Auflösung (deutlich größer als 1 µm, deutlich kleiner als 1 mm) optische Schnittbildung zu realisieren. Inwiefern der Vorteil einer im Vergleich zu Einzelzellauflösung hohen Photonenzahl für das Signal-zu-Rausch Verhältnis mit dieser Methode genutzt werden kann, wird im Zusammenhang mit den Messungen in lebendem Hirngewebe diskutiert.

2.4 Andere Ansätze für optische Schnittbildung in Hirngewebe

Durch eine kurze Betrachtung anderer Ansätze zur optischen Schnittbildung in Hirngewebe soll aufgezeigt werden, warum für einen Aufbau zur Messung funktioneller Signale im Gehirn die strukturierte Beleuchtung mit Gitterabbildung gewählt wurde.

Eine verbreitete Technik für optische Schnittbildung in biologischen Anwendungen ist die Dekonvolution (Holmes, Bhattacharyya et al. 1995). Die Gl. (2.6) impliziert, daß das Infokusbild aus dem gesamten Weitfeldbild rekonstruiert werden kann, wenn die Impulsantwort in verschiedenen Ebenen gemessen wird und dann in jeder Ebene der Beitrag des Außerfokuslichts aus allen anderen Ebenen durch inverse Faltung herausgerechnet wird. Dies wurde auch bereits in Hirngewebe demonstriert (Yae, Elias et al. 1992; Fisher, Civillico et al. 2004). Diese Technik hat jedoch Nachteile: zum einen muß die Impulsantwort bekannt sein. In biologischen Proben können jedoch Aberrationen so stark lokal variieren, daß sie für eine zuverlässige Dekonvolution nicht an genügend vielen Orten hinreichend genau gemessen werden kann (Jonkman, Swoger et al. 2003). Außerdem wird das "missing cone" Problem durch diese Technik nicht behoben, das besonders bei räumlich ausgedehnten Signalen die Tiefenlokalisation behindert.

In letzter Zeit wurden Methoden in der Weitfeldmikroskopie eingeführt, die Licht aus einer bestimmten Tiefe durch ein Kohärenzgatter selektieren (Gu, Ansari et al. 2002; Dunsby and French 2003; Dunsby, Gu et al. 2003; Yu, Mustata et al. 2003). Die Verwendung von kohärentem Licht zur Tiefenselektion beschränkt die Anwendung jedoch auf rückgestreutes Licht und schließt die tiefenselektive Fluoreszenzdetektion aus. Die Messung von Fluoreszenz ist aber für die Messung funktioneller Signale im Gehirn so bedeutend, daß darauf nicht verzichtet werden kann.

Die größte Verbreitung zur optischen Schnittbildung in biologischen Anwendungen hat das Laserscanning-Mikroskop in der Ausführung als konfokales Mikroskop (Minsky 1961; Wilson and Sheppard 1984) und als Multiphotonen-Mikroskop (Denk, Strickler et al. 1990). Insbesondere letzteres hat für die Anwendung in Hirngewebe Bedeutung erlangt, da es gegenüber dem konfokalen Mikroskop eine höhere Eindringtiefe und reduzierten Gewebeschaden ermöglicht. Die Notwendigkeit das Objekt mit dem Brennpunkt abzurastern, um ein zweidimensionales Bild des Obkjekts zu gewinnen reduziert jedoch die Zeitauflösung (ca. 0,5 s pro Bild) erheblich. Wenn also eine hohe Aufnahmegeschwindigkeit und insbesondere eine parallele Aufnahme an vielen Orten im Gehirn wichtig ist, ist die Weitfeldmikroskopie vorzuziehen. Die Bemühung, eine solche parallele Aufnahme auch in die konfokale Mikroskopie einzuführen (Juskaitis, Wilson et al. 1996) war einer der Vorläufer der in dieser Arbeit verwendeten Art der strukturierten Beleuchtung.

3 Implementierung der strukturierten Beleuchtung für Mikroskopie im Gehirn

Aus der vorangehenden Darstellung der Eigenschaften optischer funktioneller Signale im Gehirn und der zu erwartenden Auswirkung eines streuenden Objekts auf die strukturierte Beleuchtung ergibt sich, welche Ziele bei der Implementierung der strukturierten Beleuchtung für Mikroskopie im Gehirn anzustreben sind. Zum einen sollte sie in der Lage sein, funktionelle Signale, die auf einer Zeitskala von wenigen Millisekunden stattfinden, korrekt zu reproduzieren. Gleichzeitig sollte die Implementierung, eventuell unter Verwendung von räumlicher oder zeitlicher Mittelung, in der Lage sein ein Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erreichen, mit dem relative Intensitätsänderungen von deutlich unter einem Prozent sichtbar gemacht werden können. Beides soll trotz der Lichtstreuung möglich sein. Die Rekonstruktion der Infokussignale darf, wenn überhaupt, nur eine sehr kleine Fehleranfälligkeit haben. Für die dreidimensionale räumliche Auflösung hingegen gibt es eine gewisse Bandbreite von Fragestellungen in der Neurobiologie des Gehirns, so daß auch mit einer Auflösung, die deutlich über der Abbe'schen Begrenzung liegt, gearbeitet werden kann. Die Schichtstruktur des Kortex wird dadurch ausgebildet, daß sich vertikale Strukturen ähnlicher Zelltypen ausbilden. Eine Zuordnung funktioneller Signale, die z.B. durch einen Sinnesreiz hervorgerufen werden, zu einer solchen Schicht, die z.B. in Mäusen jeweils größer als 100 µm ist, liefert daher bereits wertvolle Information über die Signalverarbeitung im Gehirn. Nicht alle Anforderungen aus den Eigenschaften funktioneller Signale konnten gleichermaßen berücksichtigt werden. Insofern wurde hier eine Umsetzung realisiert, die auf hohe zeitliche Auflösung Wert legt und dabei versucht, die bei Messungen im Gehirn im Vergleich zur gewöhnlichen Weitfeldmikroskopie kaum zu vermeidende Reduktion des Signal-zu-Rausch Verhältnis gering zu halten.

3.1 Der Aufbau

3.1.1 Optik

Wie in Kapitel 3 schon erläutert, möchte man in der Weitfeldmikroskopie ein großes Bildfeld nutzen. Bei der Hirnabbildung ermöglicht dies z.B. die simultane Beobachtung einer ganzen funktionellen Einheit des Gehirns einer Ratte oder einer Maus wie dem Teil des somatosensorischen Kortex, in dem Signale aller Schnurrhaare verarbeitet werden. Ein großes Bildfeld kann aber nur mit geringer Vergrößerung erreicht werden. Ein solches abbildendes System mit geringer Vergrößerung wird im Folgenden Makroskop genannt (Ratzlaff and Grinvald 1991). Bei Verwendung kommerzieller Einzellinsen mit hoher Brennweite und hoher numerischer Apertur wären recht große Aberrationen zu erwarten. Daher werden hier als "Linsen" Photoobjektive verwendet, die eine große Brennweite mit einer vergleichsweise hohen Öffnung, also guter Auflösung und hoher Lichtstärke, verbinden. Gleichzeitig sind diese Linsen auf viele Abbildungsfehler korrigiert und haben eine Antireflexbeschichtung.

Der grundsätzliche Aufbau des Makroskops mit Epiillumination (Abbildung 2.2) wird hier übernommen. Dieser Strahlengang realisiert die sogenannte Köhler-Beleuchtung (Koehler 1893). Die Lichtquelle wird durch die Kondensorlinse in die rückwärtige Brennebene des Objektivs abgebildet und damit das Objekt homogen ausgeleuchtet, da die Lichtquelle objektseitig ins Unendliche abgebildet ist. Ein Strahlteiler lenkt das Licht in das Objektiv um. Ein weiterer Vorteil der Makroskopanordnung ist, das zwischen den Linsen ein paralleler Strahlengang ist, also kleine Abstandänderungen der Linsen zueinander durch Bewegung des Objektivs die Bildebene unverändert lassen. Außerdem ist die Vergrößerung einfach durch das Verhältnis der Brennweiten gegeben (Gl. 3.1).

In diesem Strahlengang muß nun gleichzeitig das Gitter im Durchlicht abgebildet werden, d.h. das Gitter muß hinter der Kondensorlinse positioniert werden und eine weitere Linse (ein Photoobjektiv) eingebracht werden, die das Gitter zunächst ins Unendliche abbildet, damit es vom Objektiv in dessen Brennebene abgebildet wird. Dieser Aufbau ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Der Abstand zwischen Kondensorlinse und Lichtquelle wird dann so eingestellt, daß das Bild der Lichtquelle wieder in der rückwärtigen Brennebene des Objektivs liegt. Für die Gitterabbildung ist die Optik eine Kombination zweier Makroskope (L1-O und O-L2).

Der Ausgangspunkt für den Entwurf der Optik war, das gleiche Detektions-Makroskop zu verwenden wie jenes, daß für potentielle Anwendungen schon als Detektionssystem verwendet wurde (z.B. (Spors and Grinvald 2002)), auch um eine direkte Vergleichbarkeit mit anderen biologischen Messungen zu ermöglichen. Als Objektiv wurde daher ein Photoobjektiv mit f = 50 mm und $f_{\#} = 0.95$ (Navitar, Rochester, NY, USA) und als L2 eines mit f = 135 mm und $f_{\#} = 2$ (Nikkor, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Die Vergrößerung im Detektionsstrahlengang ist damit 2,7; die Photoobjektive haben bei den vorgegebenen Brennweiten jeweils die größte kommerziell erhältliche Öffnung. Der Arbeitsabstand des Objektivs ist ca. 30 mm. Da der Kamerachip 2,136 x 2,916 mm mißt (siehe nächster Abschnitt), ist das durch den Chip begrenzte Bildfeld 0,791 x 1,08 mm groß. Der Aperturdurchmesser von L2 ist 67,5 mm, damit wird Vignettierung bis zu einem Bildfelddurchmesser von 1,38 mm vermieden. Vignettierung entsteht, wenn Randstrahlen der Strahlenbündel, die von Punkten in der Objektebene, die nicht auf der optischen Achse liegen und damit zwischen O und L2 einen Winkel zur optischen Achse haben, an L2 abgeblockt werden (siehe z.B. (Hecht 2002), S. 173). Dadurch wird die Auflösung und die Bildhelligkeit um diese Punkte reduziert. Wenn die Hauptebene von O und die Apertur von L2 den Abstand s haben, wird ein Randstrahl eines Punktes, der den Abstand d zur optischen Achse hat, um den Weg $s' = d * s/f_0$ in der Apertur von L2 verschoben. Im hier
vewendeten Detektions-Makroskop ist $d_{\text{max}} = 0,54 \text{ mm}$, $s \approx 200 \text{ mm}$ und $f_o = 50 \text{ mm}$, also $s'_{\text{max}} \approx 2,16 \text{ mm}$. Das Strahlenbündel vom Punkt auf der optischen Achse hat einen Durchmesser von $f_o/f_{\#,o} = 52,63 \text{ mm}$, so daß $f_{L2}/f_{\#,L2} \ge f_o/f_{\#,o} + 2s'_{\text{max}}$ erfüllt ist und keine Vignettierung auftritt. Sowohl die laterale als auch die axiale Bewegung des Bildfeldes wurde durch entsprechende Bewegung des Objektivs bewerkstelligt.



Abbildung 3.1: Abbildung eines Punktes, der nicht auf der optischen Achse liegt. Alle Strahlen, die von diesem Punkt augehen, werden in der Apertur der oberen Linse um s' verschoben. Zur Vermeidung von Vignettierung eines Punktes muß also der Radius der Apertur der oberen Linse um s' größer sein als die Apertur der unteren Linse.

Dann wurde ein Photoobjektiv L1 mit einer solchen Öffnung bestimmt, so daß dessen Apertur zum einen die numerische Apertur des Objektivs nicht einschränkt. Zum anderen sollte die Brennweite so groß sein, daß die Lichtquelle mit geringer Defokussierung des Kondensors in die Apertur des Objektivs abgebildet werden kann. Die Kombination L1-O bildet dann das Anregungs-Makroskop. Da die Brennweite des Kondensors nicht genau bekannt ist, kann die Brennweite von L1 nicht genau bestimmt, sondern mit einer geschätzten Brennweite des Kondensors von 50 mm nur abgeschätzt werden. Mit der Linsengleichung läßt sich berechnen, daß bei $f_{L1} = 200 \text{ mm}$ und 120 mm Abstand des Kondensors zum Gitter (wo ein Filter und ein mechanischer Shutter platziert werden) nur eine Defokussierung des Kondensors von wenigen mm benötigt wird, um ein reelles Bild der Lichtquelle in der Objektivapertur zu erzeugen. Es wurde ein Photoobjektiv mit f = 200 mm und $f_{\#} = 2,8$ verwendet (Canon EF200 II USM, Tokyo, Japan), dessen Apertur also 71,42 mm Durchmesser. Da das Bild der Lichtquelle in der rückwärtigen Brennebene des Objektivs nur einen Durchmesser von 40 mm hat, unterfüllt es die Apertur des Objektivs. Außerdem sind die Gitterstreifen ca. 200 mal breiter als die Wellenlänge des verwendeten Lichts, und die Divergenz der Strahlenbündel der Lichtquelle ist gering, so daß durch die gegebenen Aperturen weder die Beugungsordnungen des Gitters noch die Strahlenbündel der Lichtquelle eingeschränkt werden. Die Limitation der Modulationsamplitude durch Optik und Detektor werden in Kapitel 4 diskutiert.

In dem in Abbildung 2.3 gezeigten Strahlengang kann mit reflektiertem Licht gemessen werden, indem als Strahlteiler ein Neutraldichtefilter eingesetzt wird. Dieser hat für einen breiten Wellenlängenbereich eine ungefähr konstante Transmission. Durch Einsetzen eines Anregungsfilters zwischen Kondensorlinse und Gitter kann das Spektrum von Anregungswellenlängen selektiert werden.

Die Messungen im Gehirn im Rahmen dieser Arbeit wurden alle mit Fluoreszenzlicht durchgeführt. Dazu wurde der Anregungsfilter zwischen Kondensorlinse und Gitter eingesetzt. Ein Emissionsfilter zwischen L2 und dem Kamerachip blockt das rückgestreute Anregungslicht und transmittiert die Fluoreszenz. Als Strahlteiler wurde ein Farbteiler verwendet, der hohe Reflektion für das Anregungslicht und hohe Transmission für das Emissionslicht aufweist. Die genaue Spezifikation ist bei der jeweiligen Anwendung angegeben. Die Terminologie ist Zentralwellenlänge-Typ-Filterbreite, z.B. bedeutet 470BP40 einen Bandpaßfilter mit Transmission im Bereich 470 \pm 20 nm und 500LP einen Langpaßfilter, der ab 500 nm transmittiert. Wegen der erforderlichen großen Abmessungen des Strahlteilers wurde dafür stets ein Dichrolight-Filter von Linos Photonics (Göttingen, Deutschland) in der Größe 160 x 110 mm verwendet. Alle Komponenten des Aufbaus bis auf das Objektiv sind von einem Makrobank-System (Linos Photonics) gehalten. Für den Strahlteiler wurde ein Halter entworfen, so daß der Strahlteiler leicht austauschbar ist und trotzdem stets im 45° Winkel zur optischen Achse gehalten wird.

3.1.2 Kamera

Man würde zur Aufzeichnung des Weitfeldbildes gerne einen Detektor verwenden, der eine hohe Anzahl lichtsensitiver Komponenten hat, die sehr schnell ausgelesen werden können und ein geringes Signal-zu-Rausch Verhältnis aufweisen. Da das Schrotrauschen immer vorhanden ist, das lediglich mit der Wurzel der detektierten Photonen steigt, wird das Signal-zu-Rausch Verhältnis mit zunehmender Lichtintensität besser. Wenn eine hohe Intensität des funktionellen Signals erreicht werden kann, sollte der Detektor bei dieser Intensität für ein optimales Signal-zu-Rausch Verhältnis auch noch nicht saturiert sein. Die typischen Lichtdetektoren für Weitfeldbilder sind Halbleiterdetektoren. Mit einer Photodiode kann eine hohe Elektronenspeicherkapazität erreicht werden (deutlich über 10⁶ Elektronen), so daß Photodiodenfelder für optische Bildgebung schon vor längerer Zeit (z.B. (Grinvald, Frostig et al. 1988)) und bis heute (z.B. (Zochowski, Wachowiak et al. 2000)) für optische Mikroskopie im Gehirn verwendet wurden. Ein Photodiodenfeld läßt sich auch in kurzer Zeit (< 1 ms) auslesen, allerdings ist die Anzahl der Dioden relativ gering (typischerweise 100 - 600). In vielen die Fluoreszenzintensitäten Anwendungen im Gehirn sind geringer 10⁶ Photonen/(ms*Diodenfläche), weil z.B. die Fluorophorkonzentrationen gering sind oder die Anregungsintensität zur Vermeidung von Bleichen oder Gewebeschaden nicht so hoch gemacht werden können. Dann läßt sich auch mit einer kleineren Elektronenspeicherkapazität auskommen, und Photodiodenfelder können nachteilig sein, da ihr Dunkelrauschen größer ist.

In hier beabsichtigten neurobiologischen Anwendungen die den ist Fluoreszenzintensität geringer als 10⁶ Photonen/(ms*Diodenfläche), so daß hier zu einer CCD Kamera (MiCAM01, SciMedia, Tokyo, Japan) gegriffen wurde. Sie verwendet einen kommerziellen 1/5 inch CCD Chip (ICX076AL, Sony, Tokyo, Japan) mit interline Auslese, d.h. neben jeder Pixelreihe ist ein Register, in das die Elektronen ausgelesen werden. Dadurch ist die lichtsensitive Fläche des Chips kleiner als 100 %, der Füllfaktor (das Verhältnis von lichtsensitiver Fläche zu Gesamtfläche) wird aber vom Hersteller nicht angegeben. Um das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu verbessern wird das Signal von jeweils 4 x 4 Pixeln zu einem Pixel zusammengefaßt (Tominaga, Tominaga et al. 2000). Damit ergibt sich eine effektive Pixelgröße von 32,4 x 35,6 µm bei einer Anzahl von 90 x 60 Pixeln. Die minimale Aufnahmezeit ist 0,7 ms pro Bild. Es können maximal 5459 Bilder in einer Messung aufgenommen werden. Die vom CCD Chip ausgelesenen Analogsignale werden in der Kamera mit 12 Bit Tiefe digitalisiert und von der Steuerungselektronik über PCI-Auslesekarten an einen PC geschickt. Dort können die Bilder in einer zugehörigen Software angesehen werden und in der zeitlichen Folge von Werten auf einzelnen Pixeln oder in einem kleinen Gebiet die relative Intensitätsänderung angezeigt werden, so daß bei einer Aufnahme mit aus der Bildebene defokussiertem Gitter gleich das Vorhandensein funktioneller Signale überprüft werden kann. In der Software werden die digitalisierten Werte in 14 Bit Werten gespeichert, die für die Auswertung von Helligkeitsänderungen verwendet werden können. Messungen zum Rauschen der MiCAM01 sind in Kapitel 5 beschrieben.

Im Rahmen der Arbeit wurden auch zwei weitere Kameras getestet. Eine ist die Fuji Deltaron 1700 (Fujifilm Medical, Stamford, USA). Dies ist keine CCD Kamera, sondern eine MOS-basiertes monolithisches Array (Ichikawa, Iijima et al. 1993). Die Kamera hat eine hohe Elektronenspeicherkapazität (10^6 Elektronen/Pixel) und einen großen Chip (10×10 mm bei 128 x 128 Pixeln) und wird daher eingesetzt, wenn hohe Intensitäten im Bild z.B. bei Verwendung von rückgestreutem Licht oder intensiv gefärbtem Gewebe vorliegen (siehe z.B. (Spors and Grinvald 2002)). Bei kleinen Intensitäten zeigt sie ein hohes Dunkelrauschen. Außerdem werden die Bilder nur mit 8 Bit digitalisiert und dann Intensitätsänderungen duch Differenzverstärkung sichtbar gemacht. Für ein geringes $\Delta F/F$ wird die Differenzverstärkung gebraucht, außerdem wird das Rauschen erst dann groß genug, daß durch Mitteln sub-ADU Genauigkeit erreicht werden kann (siehe Kapitel 6). Da außerdem bei der Schnittbildung mit strukturierter Beleuchtung ein hoher Anteil an Hintergrundlicht nachteilig ist und viele Färbemethoden keine ausreichend hohen Fluoreszenzintensitäten ergeben, wurde die Fuji Deltaron nicht weiter verwendet. Eine der MiCAM01 vergleichbare CCD Kamera ist die NeuroCCD-sm (Redshirt Imaging, Fairfield, CT, USA). Sie bietet sogar durch einen hohen Füllfaktor, eine hohe Quanteneffizienz und etwas kleinere Pixel bei nahezu gleicher Elektronenspeicherkapazität zusätzliche Vorteile. Bei Tests zeigten sich jedoch technische Probleme (Bildverdopplungen), die nicht zu beseitigen waren. Daher wurde auch diese Kamera nicht für die Messungen eingesetzt.

3.1.3 Lichtquelle

Die Lichtquelle soll hohe Anregungsintensität liefern und die Intensitätsfluktuationen sollen kleiner als das Schrotrauschen sein. Um eine hohe Flexibilität in der Wahl der Anregungswellenlänge zu haben ist eine Weißlichtquelle vorteilhaft, so daß die Anregungswellenlänge lediglich durch einen Wechsel der Anregungsfilter erfolgen kann.

Hier wurde als Lichtquelle eine 150 W Xenon-Kurzbogenlampe (XBO 150W/CR OFR, Osram, München, Deutschland) verwendet. Sie liefert eine ungefähr gleichmäßige Lichtleistung in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 1000 nm. Das Leuchtfeld ist $0.5 \times 1.6 \text{ mm}$ groß. Dieses Modell liefert eine besonders hohe Leuchtdichte (20000 cd/cm²). Die Lampe wird mit einem Netzgerät (Modell 1600, Optiquip, New York, USA) betrieben, daß Spannungsschwankungen < 0.1 % liefert. Das zugehörige Lampengehäuse (Modell 770, Optiquip) ist mit einer Kondensorlinse (Modell NC6, Optiquip) ausgerüstet, die zum Schutz gegen Überhitzung das Infrarotlicht nicht transmittiert. Im Lampengehäuse wird noch ein zweites invertiertes Bild der Lampe erzeugt, das so justiert werden kann, daß das Bild der Lichtquelle die doppelte Fläche hat.

3.2 Demodulation für optische Schnittbildung

Die optische Schnittbildung bei der Verwendung strukturierter Beleuchtung geschieht durch die Extraktion des Infokussignals aus der modulierten Komponente der Weitfeldbilder. In Kapitel 2 wurde der Algorithmus beschrieben, der in den meisten Anwendungen bisher dafür verwendet wurde (siehe Referenzen a.O.). Wegen der eingangs erwähnten Eigenschaften funktioneller Signale im Gehirn kann dieser Algorithmus hier nicht angewendet werden. Es wurde stattdessen ein Algorithmus entwickelt, der den Anforderungen der Anwendung im Gehirn Rechnung trägt. Er wird in den folgenden Abschnitten dargestellt.

3.2.1 Probleme der Standardmethode

Der Algorithmus der Standardmethode ist in (Neil, Juskaitis et al. 1997) bzw. (Wilson and Karadaglic 2000) und in der Form mit Phasenmodulationskorrektur duch Gl. (2.23) (eigene Berechnung in Anlehnung an (Wilson and Karadaglic 2000)) gegeben. Es gibt

mehrere Gründe, warum die Anwendung dieses Algorithmus bei der funktionellen Hirnabbildung zu Problemen führen kann.

Ein erstes Problem kann in der Bestimmung der Gitterphasen liegen. Für die angestrebte Zeitauflösung im Millisekundenbereich wird ein Aufnahmetakt der Kamera von 1 ms verwendet. In dieser Zeit muß das Gitter um ca. 1/3 seiner Periode bewegt werden, was in dem hier gewählten Aufbau 71,7 µm sind. Bei einer schrittweisen Bewegung mit dieser Geschwindigkeit sind signifikante Positionierfehler nicht zu vermeiden, auch bei der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Gitterbewegung treten Positionierfehler von bis zu $2\pi/5$ auf. Daher muß auf jeden Fall eine Phasenmodulation im Infokussignal berücksichtigt werden. Für den Algorithmus in Gl. (2.23) muß die Gitterphase im jeweiligen Bild genau bekannt sein, damit sie eingesetzt werden kann. Wenn das Gitter immer auf dem ganzen Kamerachip abgebildet ist, ist die Phasenbestimmung auf mehreren 1000 Pixeln möglich, so daß dabei eine große Präzision erreicht werden kann. Typischerweise wird aber Fluoreszenz gemessen, und diese ist eventuell nur auf wenigen Pixeln zu sehen. Dann wird die Phasenbestimmung ungenau, und die Rekonstruktion des Infokussignals fehlerhaft.

Zweitens ist die Rekonstruktion schneller funktioneller Signale ein Problem für den konventionellen Algorithmus. Für die Anwendung des Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) wird angenommen, daß die Signale sich innerhalb von 3 Bildern nicht ändern. Wenn dies doch geschieht, führt dies zu Rekonstruktionsfehlern (siehe Abbildung 3.5). Funktionelle Signale ändern sich stetig und sind, zumindest wenn sie schnell sind, auch nicht näherungsweise in 3 aufeinander folgenden Bildern konstant, so daß der Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) nicht angewendet werden kann. Der hier entwickelte Algorithmus reproduziert hingegen transiente Signale mit Frequenzkomponenten bis zur halben Frequenz des Infokusmodulation korrekt.

3.2.2 Extraktion des Infokussignals durch Quadraturdemodulation

Während für den Agorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) jeweils 3 aufeinander folgende Bilder verarbeitet werden, basiert der hier entwickelte Ansatz darauf, die vollständige Zeitreihe aller Werte einer Aufnahme auf einem Pixel als amplituden- und phasenmodulierte Funktion zu beschreiben und dann die Zeitreihe zu demodulieren, um die Amplitude als Infokussignal zu berechnen. Die Zeitreihe auf einem Pixel wie in Abbildung 2.4 kann als

$$f(t) = a(t)[1 + \alpha \cos(\omega_c t + \varphi(t))] + b(t) = I_M + I_A$$
(3.1)

geschrieben werden. I_M ist die amplituden- und phasenmodulierte Infokkomponente, $I_A = a(t) + b(t)$ die Komponente, die in Abbildung 3.4 die Mittelwertänderung bewirkt, davon stellt b(t) das Außerfokussignal dar. In Abbildung 2.4 ist allerdings keine Phasenmodulation (PM) enthalten. Die Modulation hat die Frequenz ω_c , die Trägerfrequenz. Die Phasenabweichung $\varphi(t)$ stellt den Positionierfehler des Gitters dar. Der Faktor α trägt der Tatsache Rechnung, daß die Modulationsamplitude kleiner als 100 % ist.

Wenn eine zu $f(t) = f_i(t)$ um 90° phasenverschobene Zeitreihe $f_q(t)$ ermittelt werden kann und in beiden I_A beseitigt wird (was weiter unten beschrieben ist), kann das Infokussignal in dieser Situation erhalten werden, indem

$$\alpha * a(t) = \sqrt{f_i^2 + f_q^2}$$
(3.2)

berechnet wird. Diese Operation heißt Quadraturdemodulation, da f_i und f_q in der komplexen Ebene senkrecht zueinander stehen, aber gleichen Betrag haben und so ein Quadrat aufspannen:

$$f_{i}(t) = \alpha * a(t)\cos(\omega_{c}t + \varphi(t)) = \alpha * a(t)\operatorname{Re}[\exp[i(\omega_{c}t + \varphi(t))]]$$

$$f_{q}(t) = \alpha * a(t)\sin(\omega_{c}t + \varphi(t)) = \alpha * a(t)\operatorname{Im}[\exp[i(\omega_{c}t + \varphi(t))]]$$
(3.3)

Die Quadraturkomponente f_q eines solchen modulierten Signals ist durch seine Hilbert-Transformation (HT) gegeben (Gabor 1946; Ville 1948). Die Hilbert-Transformation, benannt nach dem deutschen Mathematiker David Hilbert, ist im Zeitbereich durch

$$\widetilde{f}(t) = H[f(t)] = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{f(u)}{\pi(t-u)} du, \qquad (3.4)$$

d.h. durch Faltung mit $1/\pi t$ definiert (Hilbert 1912; Titchmarsh 1937). Die Funktion 1/t ist bei endlichen Werte von t immer größer 0, d.h. die HT ist zwar stark lokalisiert, aber prinzipiell wirken Werte auf der gesamten Zeitachse auf die HT ein. Dies wird bei der Diskussion der Zeitauflösung eine Rolle spielen.

Die Phasenverschiebung durch die HT läßt sich einfacher im Frequenzbereich einsehen. Die Faltung mit $1/\pi t$ im Zeitbereich entspricht einer Multiplikation mit

$$FT\left(\frac{1}{\pi t}\right) = \begin{cases} i & f \ddot{u} r \,\omega < 0\\ 0 & f \ddot{u} r \,\omega = 0\\ -i & f \ddot{u} r \,\omega > 0 \end{cases}$$
(3.5)

im Frequenzbereich, wobei FT die Fourier-Transformation bedeutet und *i* die imaginäre Einheit. Im Frequenzbereich entspricht diese Multiplikation wegen $\pm i = e^{\pm i\pi/2}$ gleichzeitig einer Phasenverschiebung um $\pm \pi/2$.

Die Quadraturdemodulation (3.2) läßt sich nun mit Hilfe des sogenannten analytischen Signals

$$z(t) = f(t) + i\tilde{f}(t)$$
(3.6)

ausdrücken, sie ist einfach der Betrag des analytischen Signals. Das analytische Signal wurde in (Gabor 1946) und (Ville 1948) als vereinfachte Schreibweise für die Anwendung der Demodulation in der Kommunikationstheorie eingeführt.

Die Beseitigung von I_A durch Filterung ist im Frequenzbereich besonders einfach, daher sei hier auch das analytische Signal im Frequenzbereich eingeführt. Die Fouriertransformierte F der reellen Funktion f(t) ist konjugiert symmetrisch, $F_s(\omega) = F_s^*(-\omega)$, und die Fouriertransformierte der rein imaginären Funktion $i \tilde{f}(t)$ ist konjugiert antisymmetrisch, $F_a(\omega) = -F_a^*(-\omega)$. Der Stern bedeutet dabei komplexe Konjugation. Die Fouriertransformierte des analytischen Signals ist dann

$$Z(\omega) = \begin{cases} 2F(\omega) & \text{für } \omega > 0\\ F(0) & \text{für } \omega = 0\\ 0 & \text{für } \omega < 0 \end{cases}$$
(3.7)

(Marple 1999; Oppenheim and Schafer 1999). $Z(\omega)$ umfaßt also nur positive Frequenzen.

Das Spektrum der Funktion f(t) in Gl. (3.1) sieht aus wie in Abbildung 3.2 gezeigt. Es ist symmetrisch zu $\omega = 0$. Das Spektrum von I_A findet sich im Basisband um $\omega = 0$. Die Amplituden (AM)- und Phasenmodulation führen zu sogenannten Seitenbändern um die Trägerfrequenz.



Abbildung 3.2: Leistungsdichtespektrum von f(t) aus Gl.(3.1). Es ist auch bereits die Nyquist-Frequenz ω_N und die Abtastfrequenz ω_s bei 3 Abtastungen pro Periode der Trägerfrequenz eingezeichnet.

Nun werden die Auswirkungen von Amplituden- und Phasenmodulation im Spektrum erläutert.

Die Seitenbänder der AM liegen bei den Frequenzen $\omega_c \pm \omega_{AM}$, die im Basisband bei $\pm \omega_{AM}$. Wenn die Basisbandsignale, die auch die Außerfokussignale bei ω_{AF} umfassen, also ausgeschlossen werden sollen, muß $\omega_{AM} < (1/2)\omega_c$ und $\omega_{AF} < (1/2)\omega_c$ gelten. Gleichzeitig muß nun in betracht gezogen werden, daß die Zeitreihe auf dem Kamerachip zeitdiskret abgetastet wird. Daher muß daß Nyquist-Theorem beachtet werden, das besagt, daß bei diskreter Abtastung jede Frequenz, die korrekt wiedergegeben werden soll, mindestens 2 mal pro Periode abgetastet wird (Abbildung (Nyquist 1928; Shannon 1949). Wenn ω_c 3 mal pro Periode abgetastet wird (Abbildung 3.2), kann die maximale Bandbreite für das Basisband und die Seitenbänder erreicht werden.

Das Spektrum der PM ist komplizierter, da die Phase im Argument der Trägerfunktion steht. Eine harmonische PM $\varphi(t) = \beta \sin(\omega_{PM} t)$ kann noch analytisch behandelt werden, dann haben die Seitenbänder den Abstand $\omega_c \pm n\omega_{PM}$ und die Amplitude entspricht der Funktion $J_n(\beta)$, wobei J_n die Besselfunktion erster Art, Ordnung n ist (Carlson, Crilly et al. 2002). Das PM-Spektrum ist in diesem Fall effektiv bandpaßlimitiert mit der Breite $(\omega_{PM}/\pi)(\beta+1)$. Eine harmonische PM ist jedoch experimentell eher unwahrscheinlich. In (Hahn 1996) wird ein Algorithmus beschrieben, mit dem die Seitenbänder auch bei anharmonischer PM berechnet werden können, in diesem Fall kann aber kein einfacher Ausdruck für eine effektive Bandpaßlimitierung gegeben werden. Letztendlich muß für den experimentellen Aufbau eine effektive Bandpaßlimitierung überprüft werden; dies wird in Kapitel 5 getan. In den Simulationen im nächsten Abschnitt werden zwei anharmonische PM-Formen (zufällige und dreieckförmige) geprüft, in beiden Fällen ergibt sich, falls die PM so gefiltert wird, daß sie im Spektrum der Zeitreihe die gleiche Bandpaßlimitierung hat wie die AM, korrekt demoduliert werden kann. Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die Basisbandsignale I_A beseitigt werden können, wenn der Frequenzfilter

$$G(\omega) = \begin{cases} 1 & f \ddot{u} r \pi/3T \le \omega \le \omega_N \\ 0 & sonst \end{cases}$$
(3.8)

mit $Z(\omega)$ multipliziert wird, wobei T das Abtastintervall ist. Für die Seitenbänder muß gelten $\omega_{SB} \le \omega_s/6$. Die Demodulation besteht dann darin,

$$|IFT(Z(\omega) * G(\omega))|$$
(3.9)

zu berechnen, wobei IFT die inverse Fouriertransformation bedeutet. Dieses Verfahren sei QD-AS genannt (Quadraturdemodulation durch das analytische Signal).

Das Basisband enthält einen Teil der Rauschleistung, der durch $G(\omega)$ auch gefiltert wird. Die Standardabweichung von weißem Rauschen nimmt mit der Wurzel der Bandpaßbreite ab, d.h. im Falle von $G(\omega)$ um $\sqrt{2/3} = 0.81$.

Aus der endlichen Meßdauer ergibt sich eine weitere Einschränkung für die Seitenbänder. Anschaulich gesagt paßt die AM oder PM nicht mit einer ganzen Anzahl von Perioden in das Meßintervall. Bei einer endlichen Meßdauer wird die Fouriertransformation so berechnet, als würde das endliche Meßintervall unendlich oft aneinander gereiht. Die Unstetigkeitssprünge bei der Aneinanderreihung der Meßintervalle können dadurch verringert werden, daß die Zeitreihe am Anfang und am Ende mit einer halbseitigen Gaußfunktion multipliziert werden. Dann besteht das Problem nur noch für die Modulationsfrequenzen in der Nähe der zeitlichen Auflösungsgrenze. Auch dort kann das Problem wesentlich eingegrenzt werden, indem einfach eine längere Meßreihe aufgenommen wird. In den Simulationen im nächsten Abschnitt wird ein Beispiel gezeigt, wie dies bei gewünschter Zeit- bzw. Frequenzintervallauflösung implementiert werden kann.

Wenn die Trägerfrequenz höhere Harmonische enthält werden diese zusammen mit ihren Seitenbändern in den Bandpaßbereich von $G(\omega)$ gefaltet. Dieses Problem kann für die Demodulation dadurch umgangen werden, daß mit höherer Abtastrate und stärkerer Bandpaßfilterung gearbeitet wird. Wenn dabei noch das Abtastintervall verkürzt werden kann, wird die Zeitauflösung nicht eingeschränkt. Bei einer Abtastrate von 3/Periode wird die dritte Harmonische ins Basisband gefaltet und damit automatisch ausgeschlossen. Wenn n-mal pro Periode abgetastet wird und der Bandpaß auf $[\pi/nT, 3\pi/nT]$ begrenzt wird, kann für n = 4 die 2. und 4. Harmonische, für n = 5 die 2., 3. und 5. Harmonische ausgeschlossen werden

3.2.3 Simulation und Vergleich

Um das Demodulationsverfahren QD-AS zu testen wurden eine Reihe numerischer Simulationen mit dem Programm MATLAB (Mathworks, Natick, MA, USA) durchgeführt.

Mit dem diskreten Zeitparameter t, der in den Simulationen 3000 Schritte mit einer Schrittweite von $2\pi/3$ beginnend bei 0 abdeckt, bekommt die Zeitreihe in Gl. (3.1) die Form

$$\alpha a[t]\cos[t+\varphi[t]] + a[t] + b[t], \qquad (3.10)$$

die eckigen Klammern bedeuten zeitdiskrete Funktionen. Die Länge der Zeitreihe muß ein ganzzahliges Vielfaches der Anzahl von Abtastungen pro Periode sein, um das schon bei den AM-Seitenbändern diskutierte Problem der unstetigen Fortsetzung, in diesem Fall für ω_c , bei der Fouriertransformation zu vermeiden. Mit einer cosinusförmigen AM kann die Trägeramplitude als

$$a[t] = 1 + \gamma \cos[f_{AM}t]$$
(3.11)

und mit rechteckförmiger AM als

$$a[t] = 1 + \gamma * square[f_{AM}t]$$
(3.12)

geschrieben werden, wobei *square* eine periodische Rechteckfunktion bedeutet, die zwischen -1 und 1 oszilliert. Zur Demonstration wird hier $\alpha = 1$ gesetzt. Da hier das Signal-zu-Rausch Verhältnis nicht simuliert wird, spielt die absolute Größe der Modulationsamplitude keine Rolle. Die Phase wurde entweder cosinusförmig als

$$\beta \cos[f_{PM}t], \qquad (3.13)$$

als gefilterte asymmetrische Rechteckfunktion oder als gefilterte (rechteckförmiger Frequenzfilter) Folge von Pseudozufallszahlen genommen.

Abbildung 3.3 zeigt die Demodulation einer Zeitreihe mit cosinusförmiger AM und PM durch QD-AS. Die Parameter sind $\gamma = 0.01$, $\beta = 0.35$, $f_{AM} = 0.005$ und $f_{PM} = 0.05$. Auch bei $\beta = 3$, wenn also der Phasenfehler deutlich größer als die Trägerperiode wird, was experimentell auszuschließen sein sollte, bleibt die Differenz zwischen AM und

QD-AS bei 10⁻⁶, so daß sich ein relativer Rekonstruktionsfehler von 10⁻⁴ ergibt. Ein Fehler bei der Rekonstruktion eines funktionellen Signals von $\Delta F/10^4$ ist aber vernachlässigbar klein. Hier wurden auch die rechteckgefilterte asymmetrische Dreieckfunktion und die gefilterte Pseudozufallszahlenfolge als PM getestet. Bei der Zufalls-PM mit einer Standardabweichung der Phasenschwankung von 0,3 haben z.B. die Seitenbandamplituden an der Filtergrenze zunächst einen deutlichen Sprung und fallen dann langsam weiter ab, so daß mit einer Filtergrenze bei $\omega_c - \omega_s/15$ die Differenz zwischen AM und QD-AS auf 5*10⁻⁵ begrenzt ist. Auch dies ist für experimentelle Zwecke sicher ausreichend.



Abbildung 3.3: Demodulation einer cosinusförmigen AM. Die AM ist als durchgezogene Linie, die Demodulation durch Kreuze angezeigt. Für bessere Sichtbarkeit ist von der Demodulation nur jeder 10. Punkt gezeigt. Die Differenz zwischen AM und QD-AS ist von der Größenordnung 10⁻¹³, was vermutlich durch numerische Fehler in MATLAB bedingt ist.

Die Zeitauflösung der Algorithmen kann auf verschiedene Arten getestet werden. Hier zeigt sich die unterschiedliche Arbeitsweise der Algorithmen. Bei QD-AS kann erwartet werden, daß alle AM-Frequenzen innerhalb des Bandpaßfilters in Gl. (3.8) korrekt demoduliert werden. Der Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) funktioniert solange richtig, wie die AM in 3 aufeinanderfolgenden Werten als konstant angesehen werden kann. Dies zeigt sich in der Sprungantwort der beiden Demodulationsverfahren, die in Abbildung 3.4 gezeigt sind. Als AM wurde die Funktion aus Gl. (3.12) eingesetzt, die zusätzlich so gefiltert wurde, daß $\omega < -\omega_c/2$ und $\omega > \omega_c/2$ jeweils auf Null gesetzt wurden, d.h. keine AM-Seitenbänder außerhalb des Bandpassfilters in Gl. (3.8) vorhanden waren. Die andern Parameter waren wie in Abbildung 3.3. Durch QD-AS wird die AM korrekt reproduziert, der Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997)

rekonstruiert die Amplitude um ca. 10 % falsch und gibt den Zeitverlauf nicht exakt wieder.



Abbildung 3.4: Sprungantwort von QD-AS (Kreuze) und dem Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) (gestrichelt) gegen die AM (durchgezogen). Durch QD-AS wird die AM korrekt reproduziert, der Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) rekonstruiert die Amplitude um ca. 10% falsch und gibt den Zeitverlauf nicht exakt wieder.

Funktionelle Signale zeigen in der Regel und zumindest wenn sie schnell sind, keine Konstanz über mehrere Zeitwerte. Um die Zeitauflösung für sich ständig ändernde Signale zu testen kann untersucht werden, bis zu welcher Frequenz eine sinusförmige AM korrekt demoduliert wird. Dazu wurde für verschiedene AM-Frequenzen der Maximalwert des Quotienten eines Werts der AM und dem zugehörigen Wert der demodulierten Zeitreihe berechnet. Für QD-AS wurde der Notwendigkeit von Fensterung und Verlängerung der Meßzeit unter Beibehaltung der Abtastrate in Abschnitt 3.2.2 bereits erläutert. Da das Problem nur bei den Randwerten auftritt, ist es damit für (fast) alle AM-Frequenzen schon durch Fensterung zu beheben, nur bei den Frequenzen in der Nähe der zeitlichen Auflösungsgrenze können noch Rekonstruktionsfehler auftreten. In Abbildung 3.5 wurde die Zeitreihe auf 30000 Werte ausgedehnt, und die ersten bzw. letzten 2000 Werte mit der steigenden bzw. fallenden Flanke einer Gaußfunktion gefenstert. Damit ist das Problem auch an der Auflösungsgrenze behoben. Mit diesen Maßnahmen wird hier beispielhaft gezeigt, wie für eine erweiterte Menge an AM-Frequenzen eine korrekte Demodulation mit QD-AS erzielt werden kann. Eine Messung mit einer gezielten Stimulation funktioneller Signale kann immer so durchgeführt werden, daß die Werte, die durch die Fensterfunktion

verändert werden, vor der Stimulation liegen und daher kein funktionelles Signal enthalten. Wenn nicht eine Zeitauflösung bis an die Grenze heran benötigt wird, ist dies ausreichend und sollte in der Regel gemacht werden. Solange die verwendeten Farbstoffe nicht bleichen ist auch eine Verlängerung der Meßzeit ohne Schwierigkeiten. Damit kann praktisch bis an die Zeitauflösungsgrenze korrekt demoduliert werden. Daher sollten die hier beschriebenen Maßnahmen zur Verfeinerung der AM-Frequenzauflösung auch im Gehirn anwendbar sein. Damit werden alle AM-Frequenzen bei vorgegebener Frequenzauflösung bis sehr nahe an die theoretische Grenze $\omega_{AM} < 1/2 \omega_c$ korrekt demoduliert.



Abbildung 3.5: Maximum des Quotient aus AM und demodulierter Zeitreihe für verschiedene f_{AM} . Dünne Linie: QD-AS, breite Linie Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997).

In Abbildung 3.5 sieht man auch, daß für zunehmende AM-Frequenzen der Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) zunehmend größere Rekonstruktionsfehler macht, da die Annahme der Konstanz der AM in 3 aufeinander folgenden Werten zunehmend schlechter erfüllt ist. Bei vielen AM-Frequenzen oszilliert die demodulierte Amplitude über die Zeitreihe hinweg, und die Phase dieser Oszillation hängt von der relativen Phase von Trägerfrequenz und AM ab (Abbildung 3.6). Der Rekonstruktion durch den Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) ist also nicht translationsinvariant in der AM. Aus diesem Grund kann auch keine "zeitliche Modulationstransferfunktion" bestimmt werden, mit der auf den Rekonstruktionsfehler korrigiert werden kann.



Abbildung 3.6: Demodulation durch QD-AS (Kreuze) und den Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) (gestrichelt) gegen die AM (durchgezogene Linie) bei $f_{AM} = 0,4$. Oben ist die AM cosinusförmig, unten sinusförmig. Der Träger war in beiden Fällen gleich. Man sieht, daß der Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) große Rekonstruktionsfehler macht, die auch von der relativen Phase von Träger und AM abhängen. Bei QD-AS besteht dieses Problem nicht.

Es wurde auch eine Simulation durchgeführt, in der zu der Zeitreihe in Gl. (3.1) ein Term mit normalverteilten Pseudozufallszahlen mit Mittelwert 0 addiert wurde. Die Pseudozufallszahlen wurden mit der Funktion ,random' in MATLAB erzeugt. Dieser Term simuliert additives weißes Rauschen. Diese Simulation bestätigt, daß die Standardabweichung weißen Rauschens bei der Demodulation mit QD-AS um den erwarteten Faktor 0,81 reduziert wird. Der Algorithmus aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) zeigt diese Reduktion der Standardabweichung ebenfalls, so daß die Algorithmen in dieser Hinsicht gleichwertig sind. In einer weiteren Simulation wurde die Insensitivität auf die 2. und 4. Harmonische in der Trägerfrequenz geprüft, wenn 4 mal pro Trägerperiode abgetastet wird und der Filter in Gl. (3.8) auf $[\pi/4T, 3\pi/4T]$ eingeschränkt wird. Die Demodulation funktioniert dabei so gut wie in Abbildung 3.3.

Um zu testen ob auch Signale bei einer Fluoreszenz, die nur für eine kurze Zeit aufleuchtet, korrekt demoduliert werden wurde die Zeitreihe mit einer Supergaußfunktion $\exp[\sigma(t-t_0)^6]$ mit $t_0 = 1500$ und $\sigma = 5 * 10^{-9}$ multipliziert. Die Supergaußfunktion wurde gewählt, um glatte Kanten bei Anstieg und Abfall und gleichzeitig ein längeres Plateau in der Mitte zu erreichen. Das Ergebnis der Demodulation ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Zur besseren Sichtbarkeit wurde $\gamma = 0,3$ und $f_{AM} = 0.4$ gesetzt, die anderen Parameter waren wie in Abbildung 3.3. Auch hier wird die Zeitreihe durch QD-AS korrekt demoduliert.



Abbildung 3.7: Demodulation einer Zeitreihe, die mit einer Supergaußfunktion multipliziert wurde. Die AM (durchgezogene Linie) wird durch QD-AS (Kreuze) korrekt reproduziert bis auf kleine Fehler in den "Füßen" vor und nach dem Signal, wo die Nichtlokalität der Faltungsfunktion in der Hilberttransformation sich auswirkt.

Bei den Messungen in Hirngewebe mußte z.T. oft gemittelt werden. Damit das Ergebnis durch die Mittelungen nicht verfälscht wird, ist Voraussetzung, daß auch in den demodulierten Bildern das Rauschen noch eine um den Mittelwert symmetrische Verteilung hat. Dies wurde im Histogramm des Rauschens nach Anwendung von QD-AS überprüft. Der Algorithmus liefert ein um den Mittelwert symmetrisches Rauschen.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

- 2. Die Demodulation durch QD-AS ist auch möglich, wenn der Träger höhere Harmonische enthält.
- 3. Durch geeignete Länge und Fensterung der Zeitreihe können alle AM-Frequenzen fast bis zur theoretischen Auflösungsgrenze korrekt demoduliert werden.

Die Eigenschaften 1 und 3 kommen dem Standardverfahren aus (Neil, Juskaitis et al. 1997) nicht zu. Sie sind jedoch für eine zuverlässige Demodulation schneller und schwacher funktioneller Signale, wie sie im Gehirn vorkommen können, bei möglicherweise nur an einzelnen Stellen auftretender Fluoreszenz, notwendig.

3.2.4 Berechnung der konventionellen Weitfeldbilder

Auch für den Summenalgorithmus gibt es eine PM-Korrektur, die in Kapitel 2 angegeben wurde. Die PM-Korrektur zum Summenalgorithmus erfordert jedoch die explizite Kenntnis der Phasenmodulation. Für die Berechnung der konventionellen Weitfeldbilder aus denen mit strukturierter Beleuchtung wurde kein Algorithmus gefunden, der die gleichen Vorteile wie QD-AS hat. Im Gegensatz zur Schnittbildung sind hier jedoch die auftretenden relativen Fehler wesentlich kleiner, wenn die relative Modulationsamplitude deutlich kleiner als 100 % ist, da sie proportional zu den Absolutwerten der Modulation und nicht zu der Modulationsamplitude sind. Die konventionellen Weitfeldbilder wurden zur Auswertung funktioneller Signale im Rahmen dieser Arbeit nur an einer Stelle benutzt, wo der Korrekturterm wegen der geringen relativen Modulationsamplitude vernachlässigbar klein war. Das $\Delta F/F$ wird dabei sogar überhaupt nicht verfälscht. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Berechnung der konventionellen Weitfeldbilder immer der Summenalgorithmus ohne Korrektur verwendet.

3.3 Gitter und Gitterbewegung

Eine Voraussetzung für die Anwendung des Demodulationsalgorithmus QD-AS ist, daß das Seitenbandspektrum der PM effektiv bandpaßlimitiert ist. Daher muß bei der Bewegung des Gitters sichergestellt werden, daß die Positionierfehler nicht zu groß werden, denn PM enthält auch anharmonische Anteile, und die Breite des PM-Spektrums hängt, wie in Abschnitt 3.2.2 ausgeführt, dann auch von der Amplitude der Phasenmodulation ab. Gleichzeitig soll das Gitter aber mit hoher Geschwindigkeit bewegt werden. Um beide Anforderungen zu erfüllen wird ein strahlenförmiges Gitter gewählt, ein sogenannter Siemensstern, der kontinuierlich rotiert. Die Alternative wäre eine schrittweise Bewegung des Gitters, bei der schon in Abschnitt 3.2.1 ausgeführt wurde, daß sie bei der in diesem Aufbau notwendigen Geschwindigkeit von 70 µm/ms der Gitterbewegung zu größeren Positionierfehlern führt als eine konstante Gitterbewegung. Es wurde auch eine Gitterbewegung getestet, bei der im

Anregungsstrahlengang ein Zwischenbild des Gitters auf einem Scanspiegel erzeugt wurde. Dies führte jedoch in der Nähe der Umkehrpunkte des Scanspiegels zu Rekonstruktionsfehlern, so daß hier eine kontinuierliche Bewegung des physikalischen Gitters gewählt wurde.



Abbildung 3.8: Siemensstern. Aus http://megacut.com/technik/testbilder

3.3.1 Siemensstern

Der von uns benutzte Siemensstern ist eine Sonderanfertigung von IMT Masken und Teilungen AG, Greifensee, Schweiz. Er besteht aus einer Glasscheibe mit 248,28 mm Durchmesser und 1 mm Dicke, auf der 3000 Chromstreifen mit einer optischen Dichte von 3 aufgebracht sind, die also nur 0,1 % des Lichts transmittieren. Damit hat der Siemensstern ein rechteckförmiges Transmissionsprofil. Dieses wurde gewählt, da es eine höhere Gesamttransmission als ein sinusförmiges Gitter hat und somit die bessere Anregungseffizienz bietet. Auf jedem zum Mittelpunkt des Siemenssterns konzentrischen Kreis haben die Chromstreifen gleiche Breite, d.h. die einzelnen Streifen laufen nach außen keilförmig auseinander. Auf der optischen Achse des Anregungsmakroskops haben die Streifen eine Breite von 107,55 µm.

3.3.2 Phasenstarrer Regelkreis (PLL)

Um die Positionierfehler des Gitters klein zu halten muß der Siemensstern nun mit einer möglichst konstanten Winkelgeschwindigkeit rotieren. Dazu reicht nicht aus, z.B. einen Elektromotor mit konstanter Spannung zu betreiben, dessen Achse mit der Drehachse des Siemenssterns identisch ist. Die mechanischen Störungen würden zum einen zu groß sein, außerdem ist es damit schwierig, die Drehfrequenz so genau einzustellen und konstant zu halten, daß das Gitter auf dem Kamerachip immer 3 mal pro Periode abgetastet wird. Um diese Bewegung zu realisieren wurde ein phasenstarrer Regelkreis (engl. phase locked loop, PLL) entworfen.

Das Prinzip des PLL ist in Abbildung 3.9 gezeigt. Am Siemensstern wird die momentane Drehfrequenz gemessen, indem auf den Siemensstern eine LED so abgebildet wird, daß das Bild kleiner als eine Streifenbreite ist, und das reflektierte Licht von einer Photodiode gemessen wird. Das Signal der Photodiode hat dann die gleiche Frequenz wie die Helligkeitsmodulation auf einem Kamerapixel. Die Frequenz dieses Geschwindigkeitssensors wird im Komparator mit der Sollfrequenz verglichen. Die Sollfrequenz ist 1/3 des Kameratakts, damit die Modulation 3 mal pro Periode abgetatstet wird. Der Komparator erzeugt ein Signal, daß proportional zum Phasenunterschied von Soll- und Istwert ist. Mit diesem Signal wird die Drehfrequenz des Siemenssterns nachgeregelt. Wenn man mit dem Komparatorsignal direkt den Motor ansteuern würde, wird es in der Regel zu Schwingungen im Istwert kommen, da das Gesamtsystem aus Motor und Siemensstern, Regelstrecke genannt, einer Änderung des Komparatorsignals, z.B. wegen der Massenträgheit, nicht schnell genug folgen kann. Daher wird der Regelstrecke ein Regler vorgeschaltet, der das Komparatorsignal so filtert, daß es im Istwert nicht zu Schwingungen kommt. Für den Entwurf des Reglers kann es verschiedene Vorgaben geben: das eine Differenz zwischen Soll- und Istwert, Regelabweichung genannt, möglichst schnell ausgeglichen wird, oder das die Regelabweichung möglichst klein gehalten wird. Beide Vorgaben lassen sich nicht gleichzeitig erfüllen (z.B. (Berger 2001)), so daß beim Entwurf eines Reglers typischerweise eines der beiden Ziele vorgegeben wird.



Abbildung 3.9: Prinzip der PLL. Der Rückkopplungspfad ist gestrichelt.

Da der konkrete Entwurf des PLL wesentlich durch die Arbeitsweise des Motors bedingt ist, wird nun dieser zuerst beschrieben.

3.3.3 Motorentwurf

Der Motor sollte möglichst wenige Quellen für mechanische Störungen der Laufruhe aufweisen. Daher wurde ein rotierender Induktionsmotor mit kontinuierlichem Läufer gewählt (vgl. (Müller 1985)). Der Aufbau dieses Motors ist in Abbildung 3.10 skizziert.

Der Läufer wurde nach eigenen Vorgaben in der Werkstatt des Instituts gefertigt, der Rest des Motors, also im Wesentlichen die Spulenanordnung, ist der eines Schrittmotors (Vexta PK244-01AA, Oriental Motor Co., Torrance, California, USA). Die Spulen werden mir einem Wechselstrom betrieben, der zwischen aufeinanderfolgenden Spulen um 90° phasenverschoben ist. Dies erzeugt ein räumlich und zeitlich sinusförmig variierendes Feld, ein sogenanntes Wander- oder Drehfeld, daß auf die im Kupfermantel des Läufers induzierten Wirbelströme eine Lorentzkraft in tangentialer Richtung ausübt. Dadurch wird der Läufer in Rotation versetzt. Der Motor wird mit hohem Schlupf betrieben, d.h. die Rotationsfrequenz ist deutlich geringer als die Drehfeldfrequenz. Dadurch ist das Drehmoment nicht optimal, der Läufer wurde aber so entworfen, daß er unter diesen Bedingungen ein möglichst hohes Drehmoment liefert. Die Spulen haben einen gemeinsamen Weicheisenkern, der den magnetischen Fluß führt. Der Kern des Läufers ist aus weichmagnetischem Stahl (Ck45), um Hystereseverluste gering zu halten und um den magnetischen Fluß unter dem Mantel effektiv zu führen. Der Mantel ist aus Kupfer, da dort die Wirbelströme fließen, so daß eine hohe elektrische Leitfähigkeit von Vorteil ist. Das Läufermaterial ist homogen, das Gesamtdrehfeld ist jedoch zeitlich nicht konstant, so daß eine leichte Drehmomentmodulation bei der Drehfeldfrequenz entstehen kann. Um Schwebungseffekte bei der Abtastung der Gittermodulation auf dem Kamerachip zu vermeiden wird die Drehfeldfrequenz auf die halbe Kamerataktrate gesetzt.



Abbildung 3.10: Skizze zum Prinzip des Induktionsmotors. Gleichfarbige Spulen sind jeweils parallel geschaltet und die Wechselspannung in den roten und grünen Spulen gegeneinander um 90° phasenverschoben. Die Summe der rot und grün gezeichneten Feldlinien ergibt das im Text beschriebene Drehfeld, das dann im Kupfermantel des Läufers auf die dort induzierten Wirbelströme wirkt und den Läufer in Rotation versetzt.

Der Entwurf des Motors wurde auf ein trotz großem Schlupf vergleichsweise hohes Drehmoment D optimiert. Um die eben erwähnte Drehmomentmodulation möglichst schon durch die Massenträgheit zu unterdrücken sollte die zeitliche Drehfeldfrequenz, also die Wechselstromfrequenz ω_s , mit der die Spulen versorgt werden, möglichst hoch sein. Das Drehmoment nimmt aber, wenn der induktive Widerstand der Spulen über den ohmschen dominiert, mit wachsendem ω_s ab, denn es gilt

$$D \propto I_W B_s \propto \frac{\partial B_s}{\partial t} B_s \propto \omega_s B_s^2 \propto \omega_s I_s^2 \propto \frac{1}{\omega_s}$$
(3.14)

mit dem Wirbelstrom I_w , der magnetischen Induktion B_s der Spule im Kupfermantel und dem Strom I_s durch die Spulen. Für die einzelnen Umformungen wurde in dieser Reihenfolge verwendet: die Lorentzkraft $F_L \propto IB$, der Zusammenhang von Induktion und Wirbelstrom $I \propto \frac{\partial B}{\partial t}$, daß das Spulenfeld mit sinusförmigem Wechselstrom betrieben wird, daß für die Spule (näherungsweise) $I_s \propto B_s$ gilt, und das bei Dominanz des induktiven Widerstands in der Spule $I_s \propto \frac{1}{\omega_s L}$ gilt, wobei L die Induktivität ist (Müller 1985). Das für die Rotation notwendige Drehmoment wurde daher nur bei der halben Taktrate der Kamera (500 Hz) erreicht.

Da die magnetische Permeabilität von Kupfer nahezu 1 ist, stellt der Mantel für den magnetischen Fluß der Spulen einen Luftspalt dar. Die magnetische Induktion im Luftspalt kann durch Anwendung der Maxwellgleichung $\oint H \, ds = NI_s$ bei N Windungen der Spule berechnet werden. Wenn H_i das Feld im Eisenkern der Spule oder des Läufers ist, H_L das Feld im Luftspalt, l der Weg im Eisen und d im Luftspalt, gilt $H_i l + H_L d = NI_s$. Außerdem ist im Luftspalt $B = \mu_0 H_d$ und im Eisen $B = \mu \mu_0 H_i$, so daß gilt

$$B = \frac{\mu_0 N I_s}{d + l/\mu}.$$
(3.15)

Da hier $d >> l/\mu$ ist, gilt schließlich $B \propto 1/d$. Ein minimaler Luftspalt maximiert also die Induktion und damit das Drehmoment. Es wurde eine Luftspaltdicke von 0,3 mm erreicht, mit der das Drehmoment für die Rotation des Siemenssterns ausreicht. Die

Skintiefe $d = \sqrt{\frac{1}{\omega_s \sigma \mu \mu_0}}$ mit der elektrischen Leitfähigkeit σ ist für Kupfer bei 500 Hz

ungefähr 1 mm, so daß der Strom auch in den gesamten Mantel eindringt.

3.3.4 Entwurf des PLL

Der im vorigen Abschnitt beschriebene Motor ist ein Wechselstrommotor. Das Ausgangssignal des Reglers, Stellgröße genannt, muß also in eine Wechselstromstellgröße verwandelt werden, wobei die Frequenz des Drehfeldes konstant gehalten wird. Die Realisierung dieses PLLs ist in Abbildung 3.11 gezeigt. Der rechteckförmige Wechselstrom wird durch die H-Brücken erzeugt. Deren Prinzip ist in Abbildung 3.12 gezeigt. Vier DMOS Leistungstransistoren sind H-förmig um die beiden Eingänge des Motors angeordnet. Hinter den Motoreingängen liegen die jeweils 4 parallelgeschalteten Spulen aus Abbildung 3.10. Wenn an den Transistoren rechts oben und links unten ein High-Pegel (,1') anliegt, fließt der Strom durch die 4 Spulen in der einen Richtung, wenn links oben und rechts unten eine ,1' anliegt in der umgekehrten Richtung. Es wird also durch die H-Brückenschaltung ein Wechselstrom zwischen einem Erdungspotential und $\pm VCC$ erzeugt. Dies wird in Abbildung 3.11 bewerkstelligt, indem der halbe Kameratakt und der invertierte halbe Kameratakt an einer H-Brücke anliegen. Die zweite H-Brücke macht das gleiche mit einem um 90° verschobenen Takt und steuert damit die anderen 4 Spulen im Motor, so daß insgesamt das Drehfeld entsteht. Die Bausteine oberhalb der H-Brücken sind im wesentlichen dazu da, aus dem Kameratakt die beiden um 90° verschobenen Rechtecksignale mit 50 % Tastverhältnis zu erzeugen, die für die H-Brückensteuerung notwendig sind. Der Optokoppler sichert die elektrische Entkopplung des PLL von der Kamera zu deren Schutz. Das nachfolgende Monoflop verlängert die sehr kurzen Pulse des Kameratakts, so daß sie für den nachfolgenden Baustein verwertbar sind, der einen rein elektronischen PLL darstellt und das Tastverhältnis von 50 % erzeugt. Außerdem vervierfacht er die Taktfrequenz, damit der folgende Zähler, der als mehrfacher Teiler fungiert, zusammen mit dem XOR-Gatter die beiden 90° phasenverschobenen Signale erzeugen kann. Der PLL ist auch notwendig, da die Drehmomentschwankungen im Motor synchron mit der Kamerataktrate sein sollen.

Die Regelung des Motorstroms erfolgt nun, indem die Breite der Pulse variiert wird, die nach der obigen Beschreibung zunächst mit 50 % Tastverhältnis aus den H-Brücken kommen. Der andere Zweig hinter dem Zähler erzeugt diese Pulsbreitenmodulation (PWM). Dort wird zuerst das Referenzsignal für den Phasenkomparator erzeugt. Der spezielle Typ des Phasenkomparators hat drei Ausgangszustände: 5V, wenn die Phasen in die eine Richtung abweichen, 0V in der anderen Richtung und ,Aus', also ,Spannung halten', wenn die Phasen übereinstimmen. Der dritte Zustand ist notwendig, damit bei Phasenübereinstimmung der Motorstrom konstant bleibt. Bei Phasenabweichung kleiner als 2π hat das Ausgangssignal des PC2 eine Spannung zwischen 0V und 5V sowie kurze Pulse bei der Referenzfrequenz, die nach 0V und 5V abweichen. Dem Regler wird daher ein Filter vorgeschaltet, der die Amplitude der Referenzfrequenz schwächt und damit die steilen Kanten der Pulse glättet. Der Regler filtert das Signal des Phasenkomparators so, daß die Regelabweichungen gering gehalten werden. Dies wird weiter unten erläutert.



Abbildung 3.11: PLL im Detail. Es sind jeweils der Name und die Bezeichnung eines Bausteins angeeben. Die Abkürzungen bedeuten:PC2 = Phasenkomparator2, VCO = voltage controlled oscillator, XOR = exclusive OR-Gate, NAND = not-and-Gate, FS = Frame sync. = Kameratakt, PWM = pulse width modulation



Abbildung 3.12: Prinzip der H-Brückenschaltung. VCC2 bedeutet die Versorgungsspannung. Bild aus <u>http://www.pololu.com/projects/cprj0002/appn_059.pdf</u>

Die Pulse für die PWM werden an dem Komparator erzeugt. Der Komparator vergleicht zwei Eingangssignale und gibt am Ausgang 7V aus, wenn die Referenzphase vor der am Siemensstern gemessenen Phase liegt, und -2V bei umgekehrtem Phasenverhältnis. Diese Signalpegel schalten die H-Brücken an und aus und prägen deren Ausgangssignalen so die PWM auf. Der Komparator vergleicht den Ausgang der Reglers mit einer Sägezahnspannung, die eine Frequenz von 10 kHz hat und nicht phasensynchron mit der Referenz ist. Ein Zyklus der H-Brücke wird also in 20 Pulse zerlegt. Die Ausgangspegel des Komparators wurden so eingerichtet, daß die Pulse der PWM nie unter ein Tastverhältnis von 50 % sinken, da sonst der Motorstrom auch bei einer Pulsbreite größer 0 auf 0A sinken würde.

Der Aufbau des Verstärkers der Photodiode des Drehzahldetektors ist in Abbildung 3.13 gezeigt. Dessen Ausgang ist sinusförmig. Der Phasenkomparator braucht jedoch steile Kanten. Daher wird in dem NAND-Schmitt-Trigger aus dem Signal des Photodiodenverstärkers ein frequenzgleiches digitales Signal erzeugt.



Abbildung 3.13: Der Verstärker des Drehzahldetektors.

Der Aufbau des Reglers ist in Abbildung 3.14 gezeigt. Er enthält eine proportionale, eine differenzierende und eine integrierende Komponente und wird daher PID-Regler genannt. Mit diesen Komponenten lassen sich die meisten für einen Regler notwendigen Filter zusammensetzen. Wenn die Frequenzübertragungsfunktion der Regelstrecke bekannt ist, können die Parameter des PID-Reglers analytisch bestimmt werden (Berger 2001). Hier wurden jedoch alle Parameter einstellbar gelassen und solange variiert, bis der Ausgang des Phasenkomparators keine Schwingungen mehr und darüber hinaus die geringsten Regelabweichungen zeigte. Nun wird noch erläutert, wie der Regler eingestellt wurde. Der proportionale Anteil bestimmt im wesentlichen die Schnelligkeit der Regelung und ist immer notwendig. Seine Verstärkung ist durch R_P/R_1 gegeben. Sie wird zunächst auf einen Wert nahe bei 1 eingestellt. Eine Analyse der Regelstrecke ergibt, daß sie zweimal integrierend auf den Regelparameter ω wirkt. Der PC2 wird mit der Frequenz ω des Sensorsignals angesteuert, sein Ausgangssignal ist jedoch proportional zur Phase $\varphi = \int \omega dt$. Aus diesem Signal wird ein Motorstrom *I* erzeugt, der den Motor beschleunigt und zu einer Frequenzänderung $\frac{\partial \omega}{\partial t}$ am Sensorsignal führt, so daß $\omega = \int I dt$ gilt. Diese Integration in der Regelstrecke führt zu einer Phasenverschiebung von 180° im Regelparameter ω , die eine ungedämpfte Schwingung im Regelkreis bewirkt. Um sie auszugleichen wird die differenzierende Komponente benötigt, die der Integration in der Regelstrecke entgegenwirkt. Die Frequenz $f_D = \frac{1}{2\pi C_D R_D}$ wird auf ca. 200 Hz eingestellt. Dann werden R_P und R_D langsam erhöht, bis ein optimales Regelverhalten eintritt. Im Betrieb wurde R_P/R₁ = 1,1

und $f_D = 185$ Hz verwendet.



Abbildung 3.14: Aufbau des Reglers. Die hinter den Operationsverstärkern befindlichen Buchstaben D, P und I bezeichnen die differenzierende, proportionale und integrierende Komponente.

4 Charakterisierung des Aufbaus

Nachdem in vorangehenden Kapiteln die Theorie der strukturierten Beleuchtung und die Implementierung für die Anwendung im Gehirn dargestellt wurde, werden hier Messungen beschrieben, die den Aufbau charakterisieren. Die Signale sind in der Amplitude der Modulation kodiert, so daß die Amplitude und die dreidimensionale Ausdehnung der Modulation für die Signalstärke (indirekt auch für das Signal-zu-Rausch Verhältnis) und die axiale Auflösung entscheidend sind und daher zuerst betrachtet werden. Dann werden die anderen Komponenten des Aufbaus behandelt.

4.1 Modulationsamplitude

4.1.1 Messung mit einer dünnen fluoreszenten Schicht

Mit der Modulationsamplitude ist hier die Amplitude in der Brennebene des Objektivs gemeint, in die das Gitter im Anregungsstrahlengang abgebildet wird. Eine Messung der Modulationsamplitude wird daher mit einem Objekt gemacht, das in guter Näherung als zweidimensional angesehen werden kann. Dies bedeutet, daß das Objekt deutlich dünner als die Schnittdicke ist. Die Schnittdicke ist, wird weiter unten ausgeführt, als Halbwertsbreite der axialen Antwort definiert und ist für den verwendeten Aufbau ungefähr 90 µm. In der Literatur findet man Messungen der axialen Antwort in Reflexion mit einem Spiegel als Objekt (Neil, Juskaitis et al. 1997) sowie mit einer dünnen fluoreszenten Schicht (Webb, Gu et al. 2002). Sowohl die axiale Antwort in Abschnitt 4.2.1 als auch die Modulationsamplitude hier werden mit einer fluoreszenten Ebene gemessen. Die fluoreszente Ebene besteht aus einer Schicht Textmarker, die auf ein Deckglas aufgebracht wird. Der Textmarker fluoresziert grün, so daß zur Anregung ein 470BP40 Filter und als Emissionsfilter ein 500LP verwendet wird (beide HQ-Qualität, Chroma Technologies, Rockingham, VT, USA; Notation s. Kap. 3). Die Dicke des Aufstrichs des Textmarkers war dünner als 10 µm (Genauigkeit des Meßgeräts) und ist damit deutlich dünner als 90 µm. Durch die Verwendung von Fluoreszenz wird sichergestellt, daß detektierte Licht wirklich nur aus einer dünnen Schicht kommt.

Die Fluoreszenz ist nicht ganz homogen, da der Aufstrich des Textmarkers auf dem Glas nicht völlig homogen ist. Da die Modulationsamplitude auf dem Detektor natürlich von der Fluoreszenzintensität abhängt, variiert sie auch auf der fluoreszenten Ebene. Sei I_{sat} der Saturationswert der Kamera in ADU sowie I_{hell} und I_{dunkel} die maximalen und minimalen Intensitätswerte in der auf einem Pixel bei bewegtem Gitter detektierten Modulation, dann war $((I_{hell} - I_{dunkel})/I_{sat})_{max} = 0,56$, die Modulationsamplitude betrug maximal 56 % des dynamischen Bereichs der Kamera, wobei dann I_{hell} nur wenige ADU unter I_{sat} war.

In Kapitel 3 wurde ausgeführt, daß bei der Demodulation höhere Harmonische im Träger der Modulation zu beachten sind. Da das Gitter kontinuierlich bewegt wird, ist der Träger nicht das stehende Bild des Gitters selbst, sondern das auf jedem Pixel wärend der Aufnahmezeit der Kamera integrierte Bild des bewegten Gitters. Die Abbildung 4.1 zeigt das Betragsquadrat der Fouriertransformation, also das Leistungsdichtespektrum, des Pixelsignals bei einer Abtastrate von 3 und 4 mal pro Periode. Bei einer Rate von 3 mal pro Periode, was der im Experiment verwendeten Abtastrate entspricht, werden die 2., 4. und 5. Harmonische auf die Trägerfrequenz gefaltet, so daß diese nicht getrennt zu sehen sind; um sie getrennt zu sehen zu können, wurde auch mit höherer Abtastrate gemessen. In den jeweiligen Abbildungen sieht man, daß die Harmonischen mindestens um den Faktor 10^4 kleiner als der Wert bei der Trägerfrequenz sind; eine Simulation ergibt, daß sie damit bei der Demodulation zu vernachlässigen sind.



Abbildung 4.1: Leistungsdichtespektrum des bewegten Gitterbildes bei 3 und 4 Abtastungen pro Periode. Die Abtastung war mit 1 kHz, die Länge der Zeitreihen jeweils 5457 und 5456 Punkte bei 3 bzw. 4 und 5 Abtastungen pro Periode. Bei 4 Abtastungen pro Periode wäre die 2. Harmonische bei 2728 Hz zu sehen.

Die Abschwächung Harmonischen resultiert der einen aus der zum Modulationstransferfunktion der Optik, deren Auswirkung aber als gering anzunehmen ist (siehe nächster Abschnitt), sowie aus der Tatsache, daß die Gitterperiode nur wenige Pixel umfaßt und beim bewegten Gitter die Intensität während der Aufnahmezeit integriert wird. Dies läßt sich folgendermaßen begründen: die auf einem Bildpunkt zwischen den Zeitpunkten t' und t'-r bei konstanter Rotationsfrequenz des Siemenssterns integrierte Intensität ist

$$I_{\text{int}}(t') = \frac{1}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \int_{t'-\tau}^{t'} \sin\left(\frac{2\pi n}{T}t\right) dt$$

= $\frac{1}{2} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{T}{2\pi n^2} \left(-2\sin\left(\frac{\pi n}{T}t' - \frac{\pi n}{T}\tau\right)\sin\left(\frac{\pi n}{T}\tau\right)\right)$ (4.1)

Das Gitter wurde als Summe seiner Frequenzkomponenten dargestellt. An dem Ergebnis sieht man, daß die Harmonischen durch die stückweise Integration mit $(1/n^2)\sin((\pi n/T)\tau)$ abgeschwächt werden. Wenn $\tau = T/n$ ist, werden sie sogar zu Null, d.h. wenn die Periode der Fundamentalen in n Abschnitten integriert wird, verschwindet die n-te Harmonische und alle Vielfachen davon. Im Experiment ist

verschwindet die n-te Harmonische und alle Vielfachen davon. Im Experiment ist $\tau = T/3$, so daß nur die 2., 4. und 5. Harmonische eine Rolle spielen. Davon ist in Abbildung 4.1 nur die 2. Harmonische zu sehen, die 5. wird auf die Trägerfrequenz gefaltet. Auch bei $\tau = T/5$ wäre sie wegen des sinus-Faktors in dem Abschwächungsterm nicht zu sehen. Daß die 4. Harmonische so stark abgeschwächt ist zeigt, daß das Gitter mit hoher Genauigkeit ein Tastverhältnis von 50 % hat.

Zusätzlich zu der zeitlichen Integration kommt die Tatsache, daß der Kamerachip nicht aus unendlich kleinen Punkten, auf denen zeitlich integriert wird, besteht, sondern aus Pixeln endlicher Größe, die die Intensität auf einer gewissen Fläche des Bildes nochmals integrieren. Diese Integration kann so wie in Gl. (4.1) beschrieben werden mit räumlichen statt zeitlichen Koordinaten, integriert wird dann $I_{int}(t^2)$. Dies ergibt nochmals einen Abschwächungsfaktor von $(1/n)\cos((\pi n/s)x)$, wo s die räumliche Periode des Gitters und x die Breite eines Pixels ist, also insgesamt eine Abschwächung um mindestens

$$\frac{1}{n^3} \sin((\pi n/T)\tau) \cos((\pi n/s)x)$$
(4.2)

für die n-te Harmonische. Die 5. Harmonische wird dann mindestens um 1/125 abgeschwächt. Gemäß den Simulationen in Kapitel 4 wird dadurch die Demodulation auch nur um den Faktor 1/125 verfälscht. Ein Rekonstruktionsfehler in ΔF von $(1/125)^*\Delta F$ ist aber vernachlässigbar.

4.1.2 Vergleich der gemessenen Modulationsamplitude mit der theoretischen Erwartung

Die Amplitudentransmission des Gitters vom Siemensstern zum Detektor kann an mehreren Stellen beeinflußt werden: durch die optische Abbildung, durch Vorgänge im Objekt wie Absorption oder Streuung oder durch die Detektion auf der Kamera.

Die Amplitudentransmission der Optik kann durch die Modulationstransferfunktion beschrieben werden. Da, wie im vorigen Abschnitt gefunden, die Harmonischen im Bild stark abgeschwächt sind, kann hier auch ausschließlich der Transferkoeffizient der Fundamentalen betrachtet werden. Die Infokus-MTF ist durch Gl. (1.14) gegeben. Diese kann vereinfacht werden zu

$$\widetilde{\Lambda}(s) = \frac{1}{\pi} (2\beta - \sin 2\beta) \tag{4.3}$$

mit β und s wie in Gl. (2.17) definiert (Stockseth 1969). Der Modulationstransfer kann nun für den Anregungs- und den Detektionsstrahlengang getrennt berechnet werden; da aufeinanderfolgende MTFs multiplikativ sind, kann auch der Modulationstransfer für die Fundamentale bei Anregung und Detektion einfach multipliziert werden. Für die Berechnung der MTF ist, wie in Kapitel 2 ausgeführt, die Apertur relevant, die die Ausdehnung des durch die Optik geführten Strahlenbündels begrenzt. Diese wird Aperturblende genannt. In Abbildung 4.2 sind die physikalischen Blenden des verwendeten Aufbaus bezeichnet. Im Anregungswie im Detektionsstrahlengang ist die Aperturblende die Blende des Objektivs. Dies läßt sich folgendermaßen einsehen. Da das Gitter zwischen den Linsen immer nach Unendlich abgebildet ist, sind für Punkte auf der optischen Achse zwischen den Linsen die Strahlen parallel. Außerdem ist die Neigung der Strahlen von Randpunkten des abgebildeten Gitterbereichs gering (siehe Diskussion der Vignettierung in Abschnitt 3.1.1). Die Aperturen der beiden anderen Linsen außer dem Objektiv sind deutlich größer als die Objektivapertur, so daß dieses die Aperturblende in beiden Strahlengängen darstellt. Fluoreszenz wird isotrop emittiert, so daß bei der Detektion die gesamte Apertur des Objektivs genutzt werden kann. Bei der Anregung wird die Objektivapertur jedoch mit einem Durchmesser des Bildes des leuchtenden Objekts von 40 mm unterfüllt



Abbildung 4.2: Blenden im Anregungs- und Detektionsstrahlengang (gestrichelt) des verwendeten Aufbaus. Gezeigt ist die Abbildung auf der optischen Achse. Die Aperturblende ist in beiden Fällen die Blende des Objektivs. Wegen der geringen Neigung der Strahlen von anderen abgebildeten Gitter- und Objektpunkten ist sie dies auch für deren Strahlengänge.

Im verwendeten Aufbau ist $NA_{Anr} = 0,37$ und $NA_{Det} = 0,47$. Weiterhin muß die Gitterfrequenz im Objekt (also dem Bild des Anregungsstrahlengangs) sowie auf dem Kamerachip (dem Bild des Detektionsstrahlengangs) eingesetzt werden. Die Gitterstreifen des Siemenssterns verjüngen sich zur Mitte hin. Als Streifenbreite wird hier deshalb die Breite auf der optischen Achse verwendet, diese beträgt 107,55 µm. Da das Gitter dann um den Faktor 4 verkleinert wird, beträgt die Gitterfrequenz im Objekt 18,6 mm⁻¹. Auf dem Kamerachip ist es dann wieder um den Faktor 2,7 vergrößert und hat die Frequenz 6,9 mm⁻¹. Die MTF ist im Anregungs- und Detektionsstrahlengang bei diesen Frequenzen sehr nahe bei 1, so daß sich auch bei Multiplikation eine Abschwächung der Modulationsamplitude von weniger als 3% ergibt. Die dunklen Streifen auf dem Siemensstern haben eine optische Dichte von 3, d.h das physikalische Gitter hat eine Modulationsamplitude von 0.999. Die Beugung, die die Grundlage der bisher behandelten MTF darstellt, trägt also nur einen sehr kleinen Teil zur Abschwächung der Modulationsamplitude bei, und die Größe der gemessenen Modulationsamplitude wird so noch nicht erklärt.

Zur Aufnahme der Bilder wurde der in Kapitel 3 beschriebene Kamerachip verwendet. Damit wird das Bild räumlich diskret abgetastet, und zwar so, daß die Helligkeit über die Breite eines Pixels integriert wird, siehe auch (Williams 1999; Boreman 2001). Damit ist die Modulationsamplitude im Kamerabild geringer als im optischen Bild. Im verwendeten Aufbau fallen auf eine Gitterperiode 4,48 Pixel. Mit Gl. (4.2) berechnet sich die Amplitude der Fundamentalen (n = 1) bei τ = T/3 und x = s/4,48 zu 0,66, also 66 % des Ausgangswerts.

Um den Modulationstransfer bei der Gitterfrequenz auf dem Kamerachip mit einem Objekt, das nahezu 100 % Kontrast in der Objektebene hat zu messen, wurde ein Ronchi-Gitter (ein Transmissionsgitter wie der Siemensstern selbst) in die Objektebene des Makroskops gebracht und auf den Kamerachip abgebildet wurde. Das Ronchi-Gitter wurde dabei im Durchlicht mit parallelem Licht beleuchtet. Das Beleuchtungsgitter hat in der Objektebene eine Streifenbreite von 26,9 µm, das Ronchi-Gitter 25 µm. Damit wurde eine Modulationsamplitude von 67 % gemessen. Da das Gitter nicht bewegt cosinus-Term in Gl. wurde. ist nur der (4.2)anzuwenden, der eine Modulationsamplitude von 76 % ergibt. Auch die Streifenkante eines Ronchi-Gitters mit doppelter Streifenbreite ist nicht scharf, sondern immer auf 3 Pixelreihen verteilt, so daß auch von einem gewissen Übersprechen zwischen den Pixeln ausgegangen werden kann. Wenn die berechnete Modulationsamplitude von 66 % noch mit 0,67/0,76 multipliziert wird, ergibt sich eine Erwartung für die Modulationsamplitude von 58 %. Die gemessenen 56 % können also durch die zeitliche und räumliche Integration des Gitters auf dem Kamerachip und ein leichtes Übersprechen zwischen den Pixeln erklärt werden.

4.1.3 Streuung

Im Folgenden wird die Änderung der Modulationsamplitude in einer streuenden Umgebung wie dem Hirngewebe untersucht. Dieser Abschnitt beschreibt einige Grundbegriffe, die später noch verwendet werden.

Streuung in biologischem Gewebe wird durch lokale Änderungen des Brechungsindex hervorgerufen. Der Aufbau des Gehirns wurde in der Einleitung beschrieben. Die Strukturen, die in Hirngewebe Schwankungen des Brechungsindex verursachen sind im wesentlichen Zellen und Zellkompartimente ((Mobley and Vo-Dinh 2003), die folgende Darstellung ist ebenfalls an diesen Übersichtsartikel angelehnt). Daher erstreckt sich die Längenskala der Brechungsindexschwankungen in einen Bereich, der vergleichbar und sogar größer als die Wellenlänge des verwendeten Lichts (ca. 500 nm) ist, so daß die Streuung anisotrop ist (Jackson 1999). Die mikroskopische Theorie, die zur Beschreibung dieser Streuung verwendet wird, stammt von Gustav Mie (Mie 1908). Sie gilt für die Streuung an kugelförmigen Teilchen. Die meisten Streuer in Hirngewebe haben jedoch keine solche einfache geometrische Form. Die Formen sind jedoch auch im einzelnen in der Regel nicht bekannt, so daß statistische Modelle für die Lichtausbreitung in Gewebe vorgeschlagen wurden (z.B. (Das, Liu et al. 1997) und Referenzen darin). Wenn jedoch die Form und Orientierung einer statistischen Verteilung unterliegen, ist anzunehmen, daß die Lichtausbreitung zumindest mit zunehmender Anzahl von Streuereignissen von der Mie-Theorie einigermaßen angemessen beschrieben wird. In dieser Arbeit wird die Mie-Theorie nur verwendet, um Parameter eines Streuphantoms, in dem die eingebrachten Streuer in guter Näherung als kugelförmig angenommen werden können, zu bestimmen oder mit der Messung in dem Phantom zu vergleichen. Streulängen im Gewebe werden aus den jeweils am Ort zitierten Messungen aus anderen Publikationen entnommen.

Wenn P_{streu} die von einem Teilchen gestreute Leistung und I_0 auf das Teilchen einfallende Intensität bezeichnet heißt

$$\sigma_s = \frac{P_{streu}}{I_0} \tag{4.4}$$

der Streuquerschnitt. Für eine homogene zufällige Verteilung von Teilchen mit der Dichte ρ wird

$$\mu_s = \rho \sigma_s \tag{4.5}$$

der Streukoeffizient und

$$l_s = \frac{1}{\mu_s} \tag{4.6}$$

die Streulänge genannt. Da die Teilchen statistisch homogen verteilt sind ist die relative Intensitätsänderung dI_I des ungestreuten Lichts proportional zur Schichtdicke dz, und der Proportionalitätsfaktor ist gerade μ_s : $dI_I = -\mu_s dz$, so daß gilt

$$I = I_0 e^{-\mu z}, (4.7)$$

das Lambert-Beer Gesetz. Der Anteil ungestreuten (ballistischen) Lichts nimmt also exponentiell mit der Tiefe ab. Die Absorption wurde hier vernachlässigt, da in Gewebe der Absorptionsquerschnitt viel kleiner als der Streuquerschnitt ist (Mobley and Vo-Dinh 2003).

Für die Modellierung der Streuung wird auch die Winkelverteilung der Streuung wichtig sein. Sie läßt sich prinzipiell über die Berechnung des Streuquerschnitts aus der Mie-Theorie einführen. Für praktische Zwecke wird jedoch oft eine sogenannte Phasenfunktion eingeführt. Die am häufigsten verwendete ist die Henyey-Greenstein Phasenfunktion (Henyey and Greenstein 1941)

$$p_{HG}(x) = \frac{1 - g^2}{\left(1 + g^2 - 2gx\right)^{3/2}}$$
(4.8)

mit $x = \cos\theta$, $g = \langle \cos\theta \rangle$. θ ist der Winkel zwischen einfallendem und gestreutem Licht. Die Größe g, auch g-Faktor genannt, ist ein Maß für die Anisotropie der Streuung. Ein Wert von 0 entspricht isotroper Streuung, ein Wert von 1 reiner Vorwärtsstreuung (bzw. gar keiner Streuung). Im Gehirn findet man Werte zwischen 0,8 und 0.97 (Mobley and Vo-Dinh 2003).

4.1.4 Messung im Gewebephantom

Um den Effekt von Außerfokuslicht zu reduzieren wurde die Modulationsamplitude auf fluoreszenten Kügelchen (Fluoresbrite Yellow Green Microspheres, Polysciences, Eppelheim) bestimmt, deren Durchmesser der Hersteller mit $90,17 \pm 11,15$ µm angibt. Als Modulationsamplitude ohne Streuung, also bei Tiefe Null, kann nicht der Wert aus

der Messungen auf der fluoreszenten Ebene verwendet werden, da die Kügelchen schon so groß wie die Halbwertsbreite des optischen Schnitts sind (Abschnitt 4.2). Die Kügelchen können aber auch nicht wesentlich kleiner gewählt werden, da sonst nicht auf jedem Kügelchen ein Pixel gefunden werden kann, der vollständig im Bild des Kügelchens liegt, so daß nicht die volle Modulationsamplitude gemessen würde. Es wurde daher die relative Abnahme mit Hilfe von Kügelchen in verschiedenen Tiefen gemessen.

Das Einbringen von fluoreszenten Kügelchen in Hirngewebe ist aufwendig und die Streulänge im Hirn nicht exakt bekannt. Daher wurde die Änderung der Modulationsamplitude mit der Eindringtiefe in ein streuendes Medium zunächst in einem Gewebephantom mit bekannter Streulänge gemessen.

Das Gewebephantom besteht aus einem Agarosegel, in das Polystyrenkügelchen mit bekannter Größe und bekanntem Brechungsindex eingebracht werden. Über die Größe und den Brechungsindex läßt sich mit Hilfe der Mie-Theorie der Streuquerschnitt bestimmen und mit Hilfe von Gl. (4.5) und (4.6) die Streulänge. Auch der g-Faktor läßt sich mit der Mie-Theorie bestimmen, so daß sich ein Phantom herstellen läßt, in dem Streulänge und g-Faktor wenigstens für die "im Mittel" in Hirngewebe bestimmten Werte übereinstimmen oder zumindest die Streulänge nur um einen bekannten Faktor größer ist. Auch sind die Größen für einen Vergleich mit der Erwartung aus dem Modell und Gl. (4.14) damit gegeben.

Es wurden Polystyrenkügelchen mit einem Durchmesser von 0,992 um in einer Konzentration von 3.2*10⁹ Kügelchen pro mL Agarose verwendet. Die Agarose hat einen Brechungsindex von 1,336, der von Polystyren beträgt 1,56. Durch den geringen Volumenanteil der Polystyrenkügelchen liegt der durchschnittliche Brechungsindex des Phantoms nur wenig über 1,336, also nahe bei dem im letzten Abschnitt erwähnten n = 1,37 von Hirngewebe. Mit der Mie-Theorie ergibt sich dann ein g-Faktor von 0,939 bei der Anregungswellenlänge (470 nm) und 0,936 bei der Emissionswellenlänge (515 nm) der fluoreszenten Kügelchen, was ebenfalls in dem Bereich liegt, den man im Gehirn findet (Abschnitt 4.1.3). In Abbildung 4.3 ist die gemessene sowie die aus der Mie-Theorie berechnete Transmission einer dünnen Schicht des Streuphantoms gezeigt. Im Meßgerät wurde der Lichtstrahl vor und nach der Probe durch einen Lochspalt mit 1 mm Durchmesser geführt; der Spalt hinter der Probe war soweit von dieser entfernt, daß praktisch nur ballistisches Licht detektiert wurde, so daß die gemessenen Werte unmittelbar in das Lambert-Beer Gesetz eingesetzt werden können. Bis ca. 630 nm stimmen Theorie und Messung recht gut überein, bei der Anregungswellenlänge 470 nm gibt es jedoch eine deutliche Abweichung. Die Abweichung bei kürzeren Wellenlängen zeigt sich auch in Messungen, die von anderen (Theer 2004) bei einer anderen Streulänge gemacht wurden. Hier wird zur weiteren Rechnung der Meßwert zugrunde gelegt, der eine Streulänge von 130 µm bei 470 nm ergibt. Dieser Wert ist größer als der in Hirngewebe (70 µm) und wurde für das Phantom so gewählt, damit über eine größere Spannbreite von Tiefen die Modulationsamplitude gemessen werden kann.

Während im flüssigen Zustand des Gewebephantoms beim Herstellungsprozeß eine homogene Verteilung der fluoreszenten Kügelchen erreicht werden kann, erhält sich diese Verteilung beim Festwerden der Agarose nicht, da dieser Prozeß so lange dauert, daß die 90 µm großen Kügelchen zu einem großen Teil zum Boden des Phantoms sinken. Der Boden wurde für die Messung durch Drehung des Phantoms als Oberfläche genommen. Die meisten fluoreszenten Kügelchen sind dann an der Oberfläche, darunter finden sich nur vereinzelt Kügelchen in einem mittleren Tiefenabstand von jeweils ca. 1 mm. Es wurde daher eine oberflächennahe Stelle gesucht, wo sich trotzdem in geringer Tiefe weitere Kügelchen finden. Auch dort waren jedoch die nächsttiefer gelegenen Kügelchen im Rahmen der Genauigkeit der Tiefenbestimmung nicht sehr verteilt, sondern hauptsächlich in einem Abstand zu finden, der etwas über dem durchschnittlichen Kugelradius liegt. Es ergibt sich damit nur ein einziger Meßwert des Abstands der Kügelchen von 53,4 µm (40 µm Verschiebung des Objektivs, multipliziert mit n = 1,336), es wurden oberflächennah keine weiteren Kügelchen mit einem im Rahmen der Genauigkeit der Tiefenbestimmung anderen Abstand gefunden. Die Genauigkeit der Tiefenbestimmung ist durch die Genauigkeit bei der Bestimmung des Maximums der axialen Antwort wie in Abbildung 4.9 gegeben, dort war das Maximum 15 µm neben dem während der Messung aus dem Gitterkontrast geschätzten Maximum. Die Modulationsamplitude ist nach 53,4 µm gegen das benachbarte höher gelegene Kügelchen auf 70,6 % abgesunken. Die Oberfläche kann bei dem Abstand der beiden Kügelchen von ca. 180 µm als gerade angesehen werden, so daß darin keine Fehlerquelle liegt.



Abbildung 4.3: Transmission einer 160 um dicken Schicht des Streuphantoms. Grün: Mie-Theorie, Blau: Messung in einem Spektrophotometer (Cary 500, Varian Inc.).

4.1.5 Messung in Hirngewebe

Es wurde mit den gleichen fluoreszenten Kügelchen wie im vorigen Abschnitt gemessen. Die Kügelchen wurden in das Hirn einer Maus injiziert, das kurz zuvor aus dem Schädel des durch Dekapitation getöteten Tieres entnommen wurde. Das Gehirn wurde sonst keiner weiteren Behandlung oder Präparation unterworfen.

Die exakte Bestimmung der Höhe des Gewebes über den Kügelchen ist schwierig, da insbesondere die Position der Oberfläche des Gewebes nicht einfach zu bestimmen ist. Diese wurde durch den maximalen Kontrast, den das Gitter in reflektiertem Licht hat, bestimmt. Diese Messung ist aber sicher nicht genauer als 10 - 20 μ m, denn die Modulationsamplitude verhält sich wie in Abbildung 4 .9, und deren Maximum ist im unmittelbar angeschauten Kamerabild bei Fokussierung auf die Hirnoberfläche nicht besser als auf 10 – 20 μ m zu bestimmen. Außerdem hat das Gehirn keine gerade Oberfläche. Zwar wurden nahe beieinander liegende Kügelchen gemessen, aber die Krümmung der Oberfläche bleibt eine Fehlerquelle, da die Kügelchen nicht genau übereinander liegen. Zuletzt war noch zu berücksichtigen, daß das Volumen des extrahierten Gehirns während der Messung nicht völlig gleich bleibt, sondern leicht schrumpft. Durch wiederholte Oberflächenbestimmung wurde versucht, diesen Effekt abzuschätzen und die Messung darauf zu korrigieren.

Aus einer Reihe von Versuchen ergab sich nur eine Messung, in der mehrere Kügelchen relativ dicht unter einer einigermaßen geraden Oberfläche gefunden wurden, das oberste davon unmittelbar an der Oberfläche. Der Abstand, in dem sie im Schnittbild maximale Intensität zeigen, wurde mit dem Brechungsindex der oberen Gehirnschichten multipliziert (n = 1,37 als Mittelwert zwischen weißer und grauer Materie nach (Mobley and Vo-Dinh 2003)), da das Objektiv für einen Strahlengang in Luft gefertigt ist und die Dicke des Luftspalts sich ändert, so daß sich der Fokus in einem Medium mit Brechungsindex n um diesen Faktor schneller bewegt als der Abstand von Objektiv zu Objekt. Aus dieser Messung konnten zwei Datenpunkte gewonnen werden: eine relative Abnahme der Modulationsamplitude um 20 % nach 31 µm und um 70 % nach 64 µm. Die Anregungsintensität war dabei konstant.

4.1.6 Vergleich der gemessenen Modulationsamplitude mit der theoretischen Erwartung

Die Auswirkung eines streuenden Mediums auf die Modulationsamplitude wurde schon in Kapitel 2 beschrieben und wird hier noch einmal genauer ausgeführt. Wenn Beugungseffekte außer Acht gelassen werden kann die Bildentstehung durch das Nachverfolgen geometrischer Strahlen beschrieben werden, die an den Oberflächen der abbildenden Elemente gebrochen oder reflektiert werden. In einem streuenden Medium gelangen die Strahlen jedoch nicht alle bis zum geometrischen Bildpunkt, sondern ein Teil (oder ein Teil der Leistung, die in einem Strahl enthalten ist) ändert am Ort der Streuung seinen Weg und trifft nicht am Bildpunkt auf. Für das Bild des Gitters heißt das, daß ein Teil der Leistung, die sonst in einen hellen Gitterstreifen gefallen wäre, diesem Streifen verloren geht und dafür in einen dunklen Streifen fällt. Die Modulationsamplitude nimmt also durch Streuung ab. Um den Effekt der Streuung zu quantifizieren wird nun die Auswirkung auf die Abbildung des Gitters modelliert.

Das Bild des Gitters wird zum einen durch das ballistische Licht gebildet, dessen Anteil am gesamten in einer bestimmten Tiefe ankommenden Lichts exponentiell mit der Tiefe abnimmt, siehe Gl. (4.7). Da das Licht im Gehirn stark in Vorwärtsrichtung gestreut wird, kann man erwarten, daß bis zu einer gewissen Tiefe auch gestreutes Licht noch in den gleichen Gitterstreifen fällt wie Licht aus dem gleichen geometrischen Weg, daß nicht gestreut wird. Dieses Licht bildet dann ebenfalls noch das Bild des Gitters. Um den Anteil dieses Lichts in Abhängigkeit von der Tiefe zu modellieren wird hier auf ein Modell aus (McLean, Freeman et al. 1998) zurückgegriffen. Mit diesem Modell kann die Varianz der Intensität des aus einem Strahl gestreuten Lichts um diesen Strahl in Abhängigkeit von der Eindringtiefe mit den g-Faktor und der Streulänge als berechnet werden. Dabei wird Gewebeparametern auch Mehrfachstreuung berücksichtigt. Ein Modell, mit dem z.B. anhand der Phasenfunktion (4.8) das gestreute Licht berechnet wird, das in Abhängigkeit von der Tiefe noch einen Gitterstreifen trifft, wäre spätestens bei Berücksichtigung der Mehrfachstreuung wesentlich komplizierter. Daher wurde das Modell aus (McLean, Freeman et al. 1998) gewählt, obwohl es noch nicht unter Bedingungen der Streuung in biologischem Gewebe getestet wurde.

Für dieses Modell wird Kleinwinkelstreuung angenommen, d.h. für den Streuwinkel θ gilt sin $\theta \approx \theta$ und cos $\theta \approx 1$. In Hirngewebe ist diese Annahme recht gut erfüllt. Dann ergibt sich die laterale Varianz der Intensität des gestreuten Lichts zu

$$\sigma^{2}(z) = \frac{1}{3} \frac{z^{3}}{l_{s}} \left\langle \Theta^{2} \right\rangle$$
(4.9)

mit $\Theta = 2\sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$. In (Theer 2004) wird $\langle \Theta^2 \rangle$, das zweite Moment von Θ , mit der Henyey-Greenstein Phasenfunktion (4.8) ausgewertet. Dies ergibt $\langle \Theta^2 \rangle = 2(1-g)$ und damit ist

$$\sigma^{2}(z) = \frac{2}{3} \frac{z^{3}}{l_{s}} (1 - g).$$
(4.10)

Diese Varianz wird in (McLean, Freeman et al. 1998) Strahlaufweitungsfunktion (beam spread function) genannt. Sie kann nun für die Modellierung des Anteils des gestreuten Lichts an der Modulationsamplitude verwendet werden, indem für das gestreute Licht eine Verteilung mit dieser Varianz angenommen wird, die hier mit BSF (für ,beam spread function') abgekürzt sei. Die Intensität in jedem geometrischen Strahl wird im streuenden Medium entsprechend dieser Verteilung aufgeweitet. Wenn als einfallende Intensitätsverteilung eine Rechteckfunktion angenommen wird, kann das "Streubild" dieser initialen Intensitätsverteilung in einer bestimmten Tiefe durch Faltung mit der BSF erhalten werden.

Abbildung 4.4 zeigt das Bild des Gitters aus Sicht der optischen Achse und die durch Kreise angedeutete radialsymmetrische Streuung, beides zweidimensional in der Bildebene. Die Streuung parallel zu einem Gitterstreifen ist für die Modulationsamplitude nicht von Bedeutung, da in dieser Richtung keine Intensität aus dem Gitterstreifen verloren geht. Wenn die Streuer als dicht liegend angenommen werden, kann dieser Verlust vollständig in der Richtung senkrecht zu den Gitterstreifen betrachtet werden. Als Verteilung der gestreuten Intensität wird eine zweidimensionale Gaußverteilung angenommen,

$$BSF(r,\sigma) = \frac{1}{\sqrt{\pi\sigma}} e^{-\frac{r^2}{\sigma^2}},$$
(4.11)

wo σ^2 die Varianz der Verteilung ist. Die genäherte Rechteckfunktion wird als endliche Reihe von harmonischen Funktionen geschrieben,

$$f(r,k) = \frac{1}{2} + \frac{2}{\pi} \left(\frac{\sin kr}{1} + \frac{\sin 3kr}{3} + \frac{\sin 5kr}{5} + \dots \right)$$
(4.12)

die im Modell da abgebrochen wird, wo weitere Summanden nur noch eine vernachlässigbare Auswirkung auf das Ergebnis haben.

Das Bild des Gitters im Objekt, das von gestreutem Licht gebildet wird, läßt sich dann durch die Faltung

$$G_{streu}(x,k,\sigma) = \int_{-\infty}^{\infty} f(r,k) * BSF(x-r,\sigma) dr$$
(4.13)
berechnen. Dort wird dann das Anregungslicht absorbiert und Fluoreszenz wieder emittiert, die der gleichen Streuung wie bei das Anregungslicht unterliegt. Außerdem muß sie den gleichen Weg durch das streuende Medium zurücklegen. Dies wird dadurch berücksichtigt, daß die Tiefe z, die in σ gemäß Gl. (4.10) eingesetzt wird, verdoppelt wird. Die Einfluß der Wellenlängenänderung bei der Emission auf die Streulänge ist gering und wird hier vernachlässigt.



 Abbildung 4.4: Aufsicht auf das Gitter und radialsymmetrische Streuung, die durch die Helligkeit in den Kreisen angedeutet wird. Ein Lichtstrahl fällt senkrecht zur Papierebene in die helle Mitte der Kreise ein. Mit zunehmendem Abstand von dem Strahlnimmt die Intensität des gestreuten Licht ab. Die Streuung parallel zu einem Streifen führt zu keinem Verlust von Intensität innerhalb des Streifens, und da die Streuer als dicht liegend angenommen werden können, läßt sich der Intensitätsverlust als durch Streuung nur senkrecht zu den Streifen modellieren.

In Abbildung 4.5 ist das Bild des gestreuten Lichts in 40 µm Tiefe bei der Frequenz des Gitters, die im Aufbau verwendet wird, und einer für Gewebe realistischen Streulänge Streuanisotropie gezeichnet. Funktion wurde mit Hilfe und Die des Computeralgebraprogramms *Mathematica* (Wolfram Research, Champaign, IL, USA) berechnet. Das Streubild des Gitters ist im Wesentlichen sinusförmig. Dies läßt sich so einsehen: Nach Fouriertransformation lautet Gl. (4.13) FT(G) = FT(f)*FT(BSF). Die Fouriertransformation der BSF ist wieder eine Gaußfunktion, mit der die Frequenzen im Fourierraum multipliziert werden. Mit zunehmender Tiefe wird die Gaußfunktion im Ortsraum breiter, also im Fourierraum schmaler. Nach 40 µm Streuung ist sie im Fourierraum so schmal, daß alle höheren Harmonischen in der Gitterfunktion f sehr stark abgeschwächt werden. Die 7. und alle weiteren Harmonischen haben auch bei geringer Eindringtiefe kaum Einfluß auf Gstreu, so daß f nach der 5. Harmonischen abgebrochen wird.



Abbildung 4.5: Bild des Gitters aus gestreutem Licht. Als Parameter sind $k = \frac{2\pi}{53.8 \mu m}$,

 $z = 40 \,\mu$ m, $l_s = 70 \,\mu$ m und g = 0.94 angenommen.Die Faltung aus Gl. (4.13) wurde mit Mathematica berechnet, wobei die Reihe in Gl. (4.12) nach der 5. Harmonischen abgebrochen wurde. Das Rechteckgitter ist stärker sinusförmig geworden, der Mittelwert von 0,5 bleibt erhalten, aber die Amplitude ist wesentlich geringer geworden.

Die Funktion in Gl. (4.12) hat eine Modulationsamplitude von 1/2 und ist in der Amplitude symmetrisch um den Wert 1/2. G_{streu} ist auch noch symmetrisch um 1/2, aber die Modulationsamplitude ist erheblich geringer geworden.

In der gleichen Tiefe gibt es noch ein Bild des Gitters, das von ballistischem Licht gebildet wird. Seine Modulationsamplitude nimmt gemäß Gl. (4.7) ab, der Weg bis zum Detektor wird wieder durch Einsetzen des doppelten Weges durch das Medium mit $\exp\left(-2\frac{z}{l_s}\right)$ berücksichtigt. Das gesamte Bild des Gitters auf dem Detektor ist dann die Summe aus ballistischen Licht und dem Bild des gestreuten Lichts gewichtet mit dem Anteil des gestreuten Lichts $\left(1 - \exp\left(-2\frac{z}{l_s}\right)\right)$:

$$G_{ges} = \exp\left(-2\frac{z}{l_s}\right) + \left(1 - \exp\left(-2\frac{z}{l_s}\right)\right)G_{streu}$$
(4.14)

Die tiefenabhängige Modulationsamplitude ist in Abbildung 4.6 gegen die Tiefe z aufgetragen. Ab einer Tiefe, die ungefähr der Streulänge entspricht, wird das Gitter nur noch von ballistischem Licht gebildet.



Abbildung 4.6: Modulationsamplitude mit gestreutem Licht (Punkte) und mit nur ballistischem Licht in Abhängigkeit von der Tiefe des Gitters im streuenden Medium. Die Parameter für Streulänge und g-Faktor sind die gleichen wie in Abbildung 4.5.

Diese Erwartung kann nun mit den vorgestellten Meßwerten verglichen werden.

Bei der Messung in Hirngewebe wurde eine Abnahme der Modulationsamplitude um 20% in 31 μ m Tiefe und um 70% in 64 μ m Tiefe gefunden. Mit den im Abschnitt 4.1.5 diskutierten Fehlerquellen und den nicht exakt bekannten Größen der Streulänge und des g-Faktors im Gehirn sind diese Werte mit der Erwartung aus dem Modell, die in Abbildung 4.6 für die im Gehirn vorliegenden Parameter gezeichnet ist, verträglich.

Im Steuphantom wurde eine Abnahme der Modulationsamplitude auf 0.716 bei 53,2 μ m Tiefe und einer Streulänge von 130 μ m gemessen. Die Abbildung 4.7 zeigt die erwartete Abnahme der Modulationsamplitude bei einer Streulänge von 130 μ m. Da auch hier die Tiefenbestimmung nicht viel genauer als 10 μ m zu machen ist, paßt der Wert gut zu der Erwartung, und wegen der geraden Oberfläche und den genauer bekannten Größen von Streulänge und g-Faktor auch besser als der im Hirngewebe bestimmte Wert.

Der Vergleich der Erwartung mit den Messungen deutet darauf hin, daß das verwendete Modell für die Abnahme der Modulationsamplitude durch Streuung zumindest bis zu den gemessenen Tiefen von 64 μ m zuverlässige Vorhersagen macht. Außerdem sagt das Modell vorher, daß bald danach ohnehin nur noch ballistisches Licht das Gitterbild formt. Das ballistische Licht wird ja von der Streuung nicht betroffen und kann daher immer zum Gitterbild beitragen, so daß ab einer Tiefe von 70 - 80 μ m die Modulationsamplitude einfach aus dem Anteil des ballistischen Lichts berechnet werden kann.



Abbildung 4.7: Abnahme der Modulationsamplitudemit der Tiefe bei 130 µm Streulänge.

4.2 Axiale Antwort

Bisher wurde die Amplitude des Gitterbildes in der Brennebene des Objektivs charakterisiert, die die Signalstärke im Bild mit Schnittbildung bestimmt. Nun soll die Ausdehnung des Gitterbildes in axialer Richtung im verwendeten Aufbau charakterisiert werden, die die Schichtdicke bestimmt, aus der in den Bildern mit Schnittbildung Signale stammen können. Diese Schichtdicke wird durch die sogenannte axiale Antwort gemessen. Die axiale Antwort ist die Intensität in dem demodulierten Bild einer gleichmäßig hellen Fläche in Abhängigkeit von der Defokussierung, also dem Abstand der z-Position des Objekts zur Brennebene. Da diese Intensität mit der Modulationsamplitude skaliert, wird damit gleichzeitig die Modulationsamplitude bei Defokussierung gemessen.

4.2.1 Messung

Die axiale Antwort wird aus den gleichen Gründen wie bei der Messung der Modulationsamplitude auf einer fluoreszenten Ebene bestimmt. Als fluoreszente Ebene wird wieder eine dünne Schicht Textmarker benutzt, der Filtersatz bleibt ebenfalls der gleiche. Um Reflexe auf den Grenzschichten eines Deckglases, die bei der Defokussierung auftreten können, zu vermeiden und eine homogenere Fluoreszenz zu erreichen wird der Textmarker auf Papier aufgebracht. Da hier nur die Änderung der Modulationsamplitude mit Defokussierung und nicht die absolute Größe der Modulationsamplitude wichtig ist, verfälscht dieser Wechsel des Trägers die Ergebnisse nicht. Die fluoreszente Ebene bleibt ortsfest, und durch Verschiebung des Objektivs wird das Bild des rotierenden Siemenssterns in axialer Richtung über die Ebene bewegt und in jeder axialen Position eine Bildserie demoduliert.

In Abbildung 4.8 ist die gemessene axiale Antwort aufgetragen, die mit dem Demodulationsalgorithmus QD-AS aus Kapitel 3 berechnet wurde. Die axiale Schrittweite ist 30 μ m. Die Werte sind über eine Fläche von 10x10 Pixeln gemittelt. Sie sind mit Schnittbildung nicht um z = 0 zentriert, da bei der Messung die Nullposition auf die den vermuteten Maximalwert der Modulationsamplitude gesetzt wurde, der aber während der Messung nicht exakt zu bestimmen ist. Die Werte mit Schnittbildung fallen auch für verschwindende Modulationsamplitude nicht auf Null ab, da bei der Demodulation zumindest immer der Mittelwert des Rauschens verbleibt. Die Werte ohne Schnittbildung wurden mit dem in Kapitel 2 beschriebenen Summenalgorithmus ohne Phasenmodulationskorrektur bestimmt und auf das angenommene Maximum der axialen Antwort normiert. Sie zeigen kein Maximum, also keine axiale Auflösung.



Abbildung 4.8: Gemessene axiale Antwort mit Schnittbildung (schwarze Punkte) und ohne Schnittbildung (rote Punkte).

4.2.2 Vergleich der gemessenen axialen Antwort mit der theoretischen Erwartung

Die Erwartung für die axiale Antwort ist durch die MTF bei Defokussierung gegeben, also durch Gl. (2.18). Analog zur MTF für die Bildebene werden auch hier wieder Anregungs- und Detektions-MTF getrennt betrachtet. Um die gesamte MTF zu erhalten werden diese dann multipliziert:

$$\left|\widetilde{\Lambda}(z,s)_{Defok,ges}\right| = \left|\widetilde{\Lambda}(z,s)_{Defok,Anr} * \Lambda(z,s)_{Defok,Det}\right|$$
(4.15)

Die Frequenz *s* und die Aperturblende sind auch bei Defokussierung die gleichen wie für die Bildebene des Gitters. Der Vorfaktor in der Näherungslösung in Gl. (2.18) ist für die hier verwendeten Frequenzen vernachlässigbar. Die z-Koordinate wird wie in (Webb, Gu et al. 2002) eingeführt statt des Defokussierungsparameters $w_{,}$ der ja den Pfadlängenunterschied von fokussierten und defokussierten Randstrahlen an der Aperturblende und nicht die Defokussierung angibt. Die numerischen Aperturen für Anregung und Detektion sind in Abschnitt 4.1.2 gegeben. In Abbildung 4 .9 ist die MTF in der Form $k * \tilde{\Lambda}(z + \zeta, s) + n$ zusammen mit den Meßwerten abgebildet. Die Meßwerte werden bei k = 610 am besten wiedergegeben. Für *n* wurde der Mittelwert des Rauschens bei stark defokussiertem Gitter eingesetzt, denn ohne Modulation reproduziert die axiale Antwort ja nur das Rauschen. Für ζ wurde, der Symmetrie der Meßwerte entsprechend, 15 eingesetzt.



Abbildung 4.9: OTF bei Defokussierung (Linie) und gemesse axiale Antwort (Punkte). Die OTF wurde so normiert, daß die 4 zentralen Meßwerte am besten wiedergegeben werden.

Man sieht an der Abbildung, daß die axiale Antwort mit nur einem Anpassungsparameter, der nicht aus den Daten direkt abgelesen werden kann, nämlich dem Wert des Maximums k, die Messung durch die berechnete axiale Antwort

wiedergegeben werden kann. Als Halbwertsbreite der angepassten axialen Antwort ergibt sich 93,8 µm. Die Schnittbreite beträgt in diesem Aufbau also ca. 90 µm.

Die Halbwertsbreite der axialen Antwort ist im Wesentlichen als axiale Integrationsdicke für Signale bei der Schnittbildung zu verstehen. Sie gibt nicht die Auflösung in dem Sinn an, daß zwei Signale mindestens diesen axialen Abstand haben müßen, um als zwei unterschiedliche Signale identifiziert werden zu können. Für diesen Abstand könnte ein Kriterium analog zum Rayleigh-Kriterium definiert werden, indem man die axiale Antwort verwendet und zwei Punkte als getrennt auflösbar definiert, wenn Maximum der axialen Antwort des einen im Minimum der axialen Antwort des anderen liegt. Die axiale Antwort bei strukturierter Beleuchtung zeigt jedoch beim Vergleich mit konventioneller Weitfeldmikroskopie wie in Abbildung 4.8, daß dann auch Signale, die räumlich sehr ausgedehnt und weit von Punktförmigkeit entfernt sind wie die hier verwendete fluoreszente Ebene, entlang der optischen Achse aufgelöst werden können.

4.3 Optische Schnittbildung im Phantom

Die Messung auf der fluoreszenten Ebene im vorigen Abschnitt hat gezeigt, daß durch die Einführung der strukturierten Beleuchtung eine axiale Auflösung in einem Bereich erreicht werden kann, wo sie dem gewöhnlichen Weitfeldmikroskop fehlt, nämlich bei der lateralen räumlichen Nullfrequenz, die an der Spitze des "missing cone" (siehe Kapitel 2) liegt. Die Auswirkung der Schnittbildung durch strukturierte Beleuchtung bei einem stärker lokalisierten Objekten wird hier an einem Bild aus der Messung in einem Gewebephantom diskutiert. An diesem Bild kann die Rolle der Schnittbildung für die Messung funktioneller Signale illustriert werden. Das Gewebephantom ist das gleiche wie jenes, das in Abschnitt 4.1.4 beschrieben wurde.

Die Abbildung 4.10 zeigt Seitenansichten des Phantoms, die aus Bildern mit und ohne Schnittbildung rekonstriert wurden. Es wurde zwischen den Pixelwerten interpoliert, so daß sich ein geglättetes Bild ergibt, daß im konventionellen Bild die Außerfokusstruktur besser zeigt, ohne die Auflösung zu verfälschen. Man sieht, daß mit optischer Schnittbildung Licht von den Kügelchen nur in einer bestimmten axialen Position detektiert wird, nämlich dort, wo die Kügelchen auch im konventionellen Bild scharf abgebildet werden. Im konventionellen Weitfeldbild wird jedoch bei jeder Defokussierung Licht von den Kügelchen detektiert, erkennbar an den hellen Kegeln, die von den Kügelchen ausgehen. Man stelle sich nun vor, daß die Kügelchen Orte im Gehirn sind, an denen ein funktionelles Signal erzeugt wird. Bei optischer Schnittbildung würde der Ort dieses funktionellen Signals eindeutig auf den Bereich zu beschränken sein, an dem jetzt auch die Kügelchen zu sehen sind. Im konventionellen Weitfeldbild würde jedoch auf einem Pixel auch dann eine Intensitätsänderung detektiert, wenn deutlich vom Ort der Kügelchen defokussiert würde.



Abbildung 4.10: Oben: Seitenansicht eines Gewebephantoms mit eingebetten Fluoreszenzkügelchen (90 µm Durchmesser) nach optischer Schnittbildung. Die Helligkeiten wurden mit dem inversen des Gitterkontrasts skaliert, so daß auf dem Kügelchen der gleiche Helligkeitswert wie im Summenbild entsteht.

Mitte: Gleiche Seitenansicht nach Anwendung des Summenalgorithmus, also entsprechend einem konventionellen Weitfeldbild. Über und unter den Kügelchen sind helle Kegel zu sehen, die vom Licht der defokussierten Kügelchen kommen

Unten: Konventionelles Weitfeldbild nach Hintergrundsubtraktion und Reskalierung der Intensitätswerte auf das gleiche Maximum wie zuvor. Auch dann sind die Küglchen in den Schnittbildern besser lokalisiert. In der gezeigten x-z-Ebene hat das zweite Kügelchen von rechts den stärksten Beitrag an Außerfokuslicht, in einer anderen x-z-Ebene haben auch die Kügelchen links und rechts stärkere Beiträge an Außerfokuslicht.

Diese Intensitätsänderung wäre zwar auf einem Pixel geringer als bei Fokussierung auf das Kügelchen, und auch weniger lokalisiert, aber im Gehirn möchte man ohne Vorinformation über die räumliche Struktur der Signalquellen messen. Die Intensitätsänderung auf einem Pixel kann im konventionellen Weitfeldbild also aus funktionellen Signalen aus sehr unterschiedlichen Tiefen zusammengesetzt sein. Nach optischer Schnittbildung mit strukturierter Beleuchtung kann die Signalquelle hingegen immer auf die Infokusebene eingegrenzt werden. Neben dem Gewinn an axialer Auflösung, der in Abschnitt 4.2 für eine ausgedehnte Ebene gezeigt wurde, ist dies der zweite Vorteil der strukturierten Beleuchtung für die Weitfeldmikroskopie im Gehirn.

4.4 Test des Demodulationsalgorithmus QD-AS

Die Messung in Abbildung 4.8 zeigt, wie auch die Simulationen in Kapitel 3, daß der Demodulationsalgorithmus QD-AS optische Schnittbildung ermöglicht. Um auch die Reproduktion eines räumlich-zeitlichen Objekts zu testen wurde der Siemensstern auf einen rotierenden Spiegel abgebildet, dessen Oberfläche verkratzt ist. Die verkratzte Oberfläche bildet ein Objekt mit einem räumlichen Muster unterschiedlicher Reflektivität, auf daß die Modulationsamplitude sensitiv ist, daß also als Infokussignal verwendet werden kann. Durch die Rotation wird dieses Signal zeitabhängig gemacht. Die Abbildung 4.12 zeigt gewöhnliche Weitfeldbilder des rotierenden Spiegels, die mit dem Summenalgorithmus ohne Phasenmodulationskorrektur aus Gl. (3.22) berechnet wurden. Abbildung 4.11 zeigt die zugehörigen Bilder nach Demodulation mit QD-AS. Man sieht, daß die Objektstruktur auch nach der Demodulation korrekt reproduziert wird.

4.5 Weitere Komponenten des Aufbaus

4.5.1 Kamera

Die Herstellerangaben zu Kenngrößen der MiCAM01, die hier stets verwendet wird, sind in Kapitel 3 beschrieben worden. In diesem Abschnitt wird das intensitätsabhängige Rauschen und die Elektronenkapazität eines Pixels (engl. well capacity) beschrieben, die gemessen wurden.

Um das Rauschen bei verschiedenen Intensitätswerten in einer Aufnahme zu messen wurde der Kamerachip mit einem Helligkeitsgradienten beleuchtet. Die Lichtquelle ist hier eine Leuchtdiode, die mit einem Netzteil (EA-PS 3016-16, Elektro-Automatik GmbH, Viersen) versorgt wird, daß laut Hersteller weniger als 0.1% relative Spannungsschwankungen erzeugt. Dann wurde für jeden Pixel der Mittelwert und die Varianz der Werte einer Bildserie berechnet. In Abbildung 4.13 ist die jeweilige Varianz gegen die Mittelwerte aller Pixel einer Bildserie aufgetragen.



Abbildung 4.11: Demodulierte Bilder eines rotierenden Spiegels mit Kratzern. Die Bilder sind im Abstand von 20 ms aufgenommen. Der Vergleich mit Abbildung 4.12 zeigt, daß eine zeitlich veränderliche Objektstruktur korrekt reproduziert wird.



Abbildung 4.12: Gewöhnliche Weitfeldbilder des rotierenden Spiegels, durch den Summenalgorithmus reproduziert. Die Bilder sind im gleichen zeitlichen Abstand wie in Abbildung 4.11 aufgenommen.



Abbildung 4.13: Varianz gegen Mittelwert aller Pixelwerte einer Bildserie.

Gemäß den Erläuterungen in Kapitel 2.3 sollte es hier zwei Rauschquellen geben: Dunkelrauschen und Schrotrauschen. Der Ursprung des Schrotrauschens ist die Intensitätsschwankung der Lichts aufgrund des quantisierten Emissionsprozesses. Die Statistik der Photonendetektion als einer Reihe unabhängiger Ereignisse folgt dann einer Poisson-Verteilung (Saleh and Teich 1991). Die Standardabweichung der Verteilung von im Mittel $\langle N \rangle$ detektierten Photonen ist damit

$$\sigma = \sqrt{\langle N \rangle} , \qquad (4.16)$$

die Standardabweichung des Rauschens. Die Varianz ist

$$\sigma^{2} = \left\langle \left(N - \left\langle N \right\rangle \right)^{2} \right\rangle = \left\langle N \right\rangle.$$
(4.17)

Wenn zwischen dem Grauwert G (Pixelwert) im digitalisierten Kamerabild und der detektierten Photonenzahl N ein linearen Zusammenhang besteht, $G = \alpha N$, kann zwischen der Varianz des Rauschens, gemessen in Grauwerten, und dem mittleren Grauwert folgender Zusammenhang berechnet werden:

$$\left\langle \left(G - \langle G \rangle\right)^2 \right\rangle = \left\langle \left(\alpha N - \langle \alpha N \rangle\right)^2 \right\rangle = \left\langle \left(\alpha N - \alpha \langle N \rangle\right)^2 \right\rangle$$
$$= \left\langle \alpha^2 \left(N - \langle N \rangle\right)^2 \right\rangle = \alpha^2 \left\langle \left(N - \langle N \rangle\right)^2 \right\rangle$$
$$= \alpha^2 \sigma^2 = \alpha^2 \langle N \rangle = \alpha^2 \left\langle \frac{G}{\alpha} \right\rangle = \alpha \langle G \rangle$$
(4.18)

und damit

$$\alpha = \frac{\left\langle \left(G - \left\langle G \right\rangle\right)^2 \right\rangle}{\left\langle G \right\rangle}.$$
(4.19)

Die Varianz des Rauschens geht in Abbildung 4.13 bei kleinen Grauwerten nicht gegen Null, wie es für reines Schrotrauschen der Fall sein müßte. Der auf den Grauwert 0 extrapolierte Wert der Varianz entspricht dem Dunkelrauschen. Da die Varianzen von unabhängigen Rauschquellen additiv sind, kann der Dunkelwert von der Varianz des Rauschens bei den höheren Grauwerten abgezogen werden. Laut Gl. (4.19) steigt die Varianz des Schrotrauschens linear mit den Grauwerten an. Ein solcher linearer Bereich ist in Abbildung 4.13 bis ungefähr zum Grauwert 10000 zu sehen, danach allerdings wächst die Varianz schwächer als linear. Da das Schrotrauschen eine Intensitätsfluktuation des Lichts selbst ist, kann die Varianz des Rauschens des detektierten Lichts nicht kleiner als das Schrotrauschen werden. Die Varianz im Bereich der Grauwerte über 10000 muß also durch einen weiteren Effekt bedingt sein. Das Absinken auf Null kurz unter der Saturationsgrenze ist dadurch erklärbar, daß bei Mittelwerten in der Nähe des Saturationsgrenze das Rauschen über der Saturationsgrenze liegen kann und dann immer auf den Saturationswert gesetzt wird, so daß die Varianz dort gegen 0 geht. Aber da das Rauschen hier einer gauß'schen Verteilung unterliegt sind in einem Abstand von 3σ vom Mittelwert bereits über 98% der Werte enthalten. Die 3σ -Breite entspricht ungefähr 90 Grauwerten, so daß das Absinken ab dem Grauwert 10000 so nicht erklärt werden kann. Dieser Effekt wurde auch in diversen Messungen reproduziert, außerdem wurde das korrekte Einlesen der Daten in das Auswertungsprogamm sorgfältig überprüft, so daß ein Meß- oder Auswertungsfehler unwahrscheinlich ist. Auch die angenommene Linearität zwischen Grauwert und Photonenzahl, die gemessen wurde, indem die eingestrahlte Intensität durch Neutraldichtefilter verändert wurde, kann im Rahmen der Meßungenauigkeit bestätigt werden. Bemerkenswerterweise wird vom Hersteller das Signal-zu-Rausch Verhältnis bei Saturation mit 56 dB angegeben, was einer Elektronenkapazität eines Pixels von ca. 400 000 Elektronen entspricht. Dieser Wert ergibt sich auch bei dieser Messung, wird dann aber nur erreicht, wenn auch die gemessene Verringerung der Varianz vorliegt. Es wurde jedoch keine Erklärung für die Verringerung der Varianz des Rauschens gefunden. Die im folgenden Kapitel beschriebenen biologischen Messungen von funktionellen Signalen, bei denen das Signal-zu-Rausch Verhältnis von Bedeutung ist, wurden alle bei Fluoreszenzintensitäten durchgeführt, bei denen hier ein linearer Zusammenhang zwischen Varianz und Grauwert gemessen wurde.

Abbildung 4.14 zeigt das Leistungsdichtespektrum des Rauschens der MiCAM01, gemittelt über 100 Pixel. Es ist weißes Rauschen. Abbildung 4.15 zeigt das Histogramm der Werte auf einem Pixel bei konstanter Beleuchtung. Es zeigt eine um den Mittelwert symmetrische Verteilung des Rauschens. Da bei kleinen relativen Helligkeitsänderungen eventuell eine große Anzahl von Bildern gemittelt werden muß, sind beide Eigenschaften, die gleichmäßige spektrale und die um den Mittelwert symmetrische Verteilung von Bedeutung, damit die Grauwerte in den gemittelten Bildern nicht verfälscht werden. In Kapitel 4 wurde gezeigt, daß der Demodulationsalgorithmus QD-AS beide Eigenschaften erhält (die "Farbe" des Rauschens dabei bezogen auf die Frequenzen im spektralen Bandpass), so daß auch die Bilder nach Demodulation ohne Verfälschungen gemittelt werden können.



Abbildung 4.14: Die Leistungsdichte des Rauschens der Kamera ist über alle Frequenzen gleichmäßig verteilt, daß Rauschen ist weißes Rauschen.Der Mittelwert aller Werte auf einem Pixel wurde abgezogen.



Abbildung 4.15: Histogramm der Grauwerte von reinem Rauschen auf einem Pixel. Der Mittelwert auf diesem Pixel beträgt 4349,2 Grauwerte.

4.5.2 Auswirkung von Kamerasaturation auf die Modulationsamplitude

Daß Außerfokuslicht ist das nicht mehr (oder nicht mehr sichtbar) modulierte Licht. Es macht auf dem Kamerabild eine Hintergrundhelligkeit. Wenn die Kamerapixel noch nicht saturiert werden, hat es nur den Effekt, die detektierten Werte anzuheben, d.h. die Modulationsamplitude bleibt gleich, ist jedoch bei höheren Werten. Der Einfluß auf das Rauschen sei hier vernachlässigt. Wenn die Kamera jedoch saturiert wird, werden auch die Maximalwerte der Modulationsamplitude durch die Saturation begrenzt. Für die Modulation bleibt nur der dynamische Bereich zwischen dem Hintergrund und der Saturation, so daß dann ein Anstieg im Außerfokuslicht die Modulationsamplitude reduziert.

einfach demonstriert Dies kann werden, indem bei der Messung der Modulationsamplitude auf der fluoreszenten Ebene ein Spiegel unter das Deckglas gelegt wird. Das Deckglas ist ca. 150 µm dick, so daß bei der im nächsten Abschnitt bestimmten axialen Antwort auf dem Spiegel die Modulation fast vollständig unterdrückt ist. Der Spiegel reflektiert also zum einen von der isotrop emittierten Fluoreszenz ein nicht moduliertes Licht, daß zum Außerfokuslicht beiträgt. Ein zweiter Beitrag stammt vom reflektierten Anregungslicht, daß ebenfalls wieder nicht-modulierte Fluoreszenz anregen kann. Wenn, wie in in der Messung in Abbildung 4 .16 links gezeigt, die Kamera zuvor bereits saturiert war, muß die Anregungsintensität reduziert werden, damit zusammen mit dem vom Spiegel reflektierten Außerfokuslicht die Intensität auf der Kamera nicht über die Saturationsgrenze geht. Dies ist für die Messung in Abbildung 4 .16 rechts geschehen. Es ist ersichtlich, daß dann die Modulationsamplitude bei ungefähr gleichen Helligkeitswerten deutlich (ungefähr

Faktor 3) reduziert ist. Die Modulationsamplitude ist proportional zu der Anregungsintensität, d.h. was die Modulationsamplitude bei Anwesenheit von Außerfokuslicht, das mit der Modulationsamplitude zusammen die Saturationsgrenze der Kamera überschreitet, limitiert, ist, daß dann die Anregungsintensität reduziert werden muß. Der Spiegel simuliert hier nur in einfacher Weise ein nicht-moduliertes Licht, das wie Außerfokuslicht wirkt, und gibt nicht quantitativ wieder, was in Gewebe passiert. Qualitativ verhält sich die Außerfokusfluoreszenz aber so wie das hier erzeugte nicht-modulierte Licht.



Abbildung 4 .16: Modulationsamplitude ohne und mit Außerfokuslicht. Das Außerfokuslicht wird durch Reflexion auf einem Spiegel erzeugt, in beiden Fällen wird die Anregungsintensität so eingestellt, daß die Kamera fast saturiert wird.

4.5.3 Siemensstern

Beim Siemensstern sind drei Eigenschaften von Bedeutung, die die Rekonstruktion des Infokussignals beeinflußen können: eine axiale Bewegung, eine ungleichmäßige Streifenbreite und eine Exzentrizität der Drehachse.

Wenn der Siemensstern schräg eingespannt ist, daß er nicht immer senkrecht zur optischen Achse steht, überträgt sich diese axiale Bewegung auch auf das Bild des Siemenssterns im Objekt, so daß das der modulierte Teil des Bildes aus unterschiedlichen axialen Positionen kommt. Um diese Bewegung abzuschätzen wurde ein Laserstrahl auf dem Siemensstern reflektiert und die Bewegung des reflektierten Strahls beobachtet. Daraus kann die Bewegung des Siemenssterns selbst berechnet werden. Den axialen Abbildungsmaßstab erhält man, indem der laterale Abbildungsmaßstab quadriert wird (Hecht 2002). Die axiale Bewegung des Siemenststerns ist bei einer Umdrehung maximal 10 µm, der axiale Abbildungsmaßstab ist 0.0625, so daß diese Bewegung im Objekt vollständig vernachlässigt werden kann. Auch auf der Kamera wird keine Modulation der Amplitude des Bildes des Siemenssterns bei der Rotationsfrequenz beobachtet.

Eine regelmäßige Rechteckfunktion enthält nur Fourierkomponenten bei ungeraden Harmonischen. In den Leistungsdichtespektren des bewegten Gitters auf der fluoreszenten Ebene in Abschnitt 1.1.1 wäre die 2. Harmonische zu sehen gewesen, dort zeigte sich aber nur eine relative Amplitude der 2. Harmonischen von 10^{-4} , die bei einer Abtastung mit 3 Werten pro Periode des Trägers zu relativen Rekonstruktionsfehlern von nur 10^{-4} führen, so daß für diesen Aufbau von einer ausreichend regelmäßigen Gitterstruktur ausgegangen werden kann.

Eine Exzentrizität der Aussparung im Siemensstern für die Drehachse relativ zum Punkt, in dem die Streifen des Siemenssterns zusammenlaufen würde bei einer konstanten Rotationsfrequenz eine Variation in der Modulation im Bild und im Drehzahlsensor hervorrufen, die periodisch mit der Umdrehungszahl (0,11/s) ist. Der Regelkreis sollte diese Variation ausgleichen, so daß im Signal des Phasenkomparators eine langsame Änderung mit der Rotationsfrequenz enthalten sein sollte. Diese wurde aber nicht beobachtet. Außerdem wurde die Modulationsfrequenz in jeweils 1 s langen Abschnitten einer 5 s langen Messung bestimmt. Sie zeigte keine systematische Abweichung von der Referenzfrequenz.

4.5.4 PLL

Das Regelverhalten des PLL, der die Rotation des Siemenssterns steuert, läßt sich am besten am Ausgangssignal des Phasenkomparators beobachten. In Kapitel 4 wurde die Arbeitsweise des Phasenkomparators beschrieben. Sobald die Phasenabweichung größer als 2π wird, geht der Ausgang entweder auf 0 Volt (wenn Vergleichsfrequenz höher als die Referenzfrequenz ist) oder 5 Volt (wenn die Vergleichsfrequenz geringer als die Referenzfrequenz ist). Bei Gleichheit der Frequenzen wird die Ausgangsspannung gehalten. Abbildung 4.17 zeigt einen kurzen Ausschnitt des Ausgangssignals des gefülterten Phasenkomparators.

Die schnellen Osillationen stammen von Peaks, die an jeder Flanke des Referenzsignals bei einer Phasenabweichung entstehen. Bei exakter Phasenübereinstimmung wäre das Ausgangssignal des Phasenkomparators konstant. Der lokale Mittelwert in den schnellen Oszillationen entspricht der lokalen Phasenabweichung relativ zu den 2π zwischen 0 und 5 Volt. Dies bedeutet, daß die Phasenabweichung zwischen dem Bildtakt der Kamera dem Signal des Drehzahlsensors kleiner als 20% bleiben. Da die Phase des Signals des Drehzahlsensors und die des Bildes des Siemenssterns auf der Kamera phasenstarr sind, kann damit letztlich von der gleichen Phasenmodulation des Infokussignals ausgegangen werden.

Um die Bandpasslimitierung des Spektrums der Phasenmodulation zu prüfen wurde das Signal des Drehzahlsensors digital aufgezeichnet mit der gleichen Abtastrate wie das Gitter auf dem Kamerachip, also 3 Abtastungen pro Periode. Da das Sensorsignal nur die Phasen- und nicht die Amplitudenmodulation enthält, kann die Phasenmodulation im Leistungsdichtespektrum des Sensors direkt gesehen werden. Abbildung 4.18 zeigt das Leistungsdichtespektrum in logarithmischer Auftragung. Die Spitze bei 908 Hz

entspricht der Trägerfrequenz des Sensors. Bei 660 Hz ist deutlich eine Kante in den Seitenbändern zu sehen, die eine effektive Bandlimitierung des Spektrums der Phasenmodulation bedeutet. Die Bandpasskante liegt deutlich vor der Bandpassbegrenzung im Demodulationsalgorithmus QD-AS. so daß auch die Phasenmodulation des Gitters auf dem Kamerachip hinreichend bandpasslimitiert ist.



Abbildung 4.17: Ausgangssignal des gefilterten Phasenkomparators. Die schnellen Oszillationen kommen von den Peaks, die auf dem Phasenkomparatorsignal immer enthalten sind, solange die Phasenabweichung kleiner als 2π ist.



Abbildung 4.18: Leistungsdichtespektrum des Sensors

5 Messungen in Hirngewebe

Es wurden zwei Arten vom Messungen an lebendem Gewebe gemacht. Zum einen wurden die Blutgefäße einer Maus *in vivo* mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt und dann Aufnahmen mit strukturierter Beleuchtung gemacht. Dies erzeugt ein statisches Fluoreszenzbild, an dem die optische Schnittbildung demonstriert werden kann. Zum anderen wurden Zellen in einem Hirnschnitt aus dem Hippocampus einer Ratte mit einem fluoreszenten Kalziumindikator angefärbt und dann elektrisch stimuliert. Man erhält dann zeitabhängige Signale, die funktionellen Signalen ähnlich sind, und an denen das Signal-zu-Rausch Verhältnis bei optischer Schnittbildung mit strukturierter Beleuchtung untersucht werden kann.

5.1 Gefärbte Blutgefäße *in vivo*

Die Anfärbung des Blutplasmas ist eine einfache Möglichkeit, räumlich begrenzte Strukturen im Gehirn anzufärben ohne das Hirngewebe zu verletzen. Als Versuchstier wurden 3 Wochen alte Mäuse (C57/B6, Charles River Laboratories, Deutschland) verwendet. Zur Anästhesie wurde Urethan (0,14 % in physiologischer Kochsalzlösung) intraperitoneal injiziert. Dann wurde das Fell über dem Schädel entfernt und der Schädelknochen auf ungefähr 50 µm Dicke ausgedünnt. Als Farbstoff wurde Fluorescein-Iso-Thiozyanat Dextran (FITC-Dextran) (FD-500s, Sigma, St.Louis, USA) in physiologischer Kochsalzlösung (10 % Vol.) gelöst und 100 µL über eine Vene im Schwanz der Maus in das Blut injiziert (für die Methode siehe (Kleinfeld, Mitra et al. 1998)). Die Molekülgröße von FITC-Dextran (Molekulargewicht 464000) reicht aus, daß der Farbstoff nicht durch die Gefäßwand diffundiert und somit die Färbung des Gewebes vermieden wird. Dies wurde vor jeder Messung überprüft, indem das Gehirn bis zu einer Tiefe von ungefähr 400 µm mit einem Zweiphotonen-Laserscanning-Mikroskop abgebildet wurde, das Licht nur aus einem Beobachtungsvolumen sammelt, dessen Größe in der Nähe der Beugungsgrenze liegt, so daß die Fluoreszenz sehr gut lokalisiert werden kann. In den hier gezeigten Messungen war das Hirngewebe nicht sichtbar gefärbt (Abbildung 5.1). Zur Fixierung des Kopfes wurde eine der Schädelform angepaßte Metallplatte auf den Schädel geklebt, die eine 2 x 2 mm große Öffnung hat, die über dem somatosensorischen Kortex des Gehirns platziert wird. Um das Austrocknen der Knochens zu verhindern wurde ein Tropfen physiologische Kochsalzlösung in der Öffnung der Metallplatte aufgebracht. Dann wurde das gesamte Tier auf seinem Halter so weit verkippt, daß die Schädeloberfläche möglichst senkrecht zur optischen Achse war. Während der Präparation und der Messung wurde die Temperatur des Tiers rektal gemessen und über ein Heizkissen unter dem Tier bei ca. 36,5 °C gehalten.

Folgende Filter wurden verwendet: als Anregungsfilter ein 470BP40 (HQ-Qualität, Chroma Technologies, Rockingham, VT, USA), als Emissionsfilter ein 500LP (HQ, Chroma) und als Strahlteiler ein Dichrolight Y-52 (Linos Photonics, Göttingen, Deutschland).



Abbildung 5.1: Abbildung eines mit FITC-Dextran gefüllten Gefäßes im Zweiphotonen-Mikroskop. Das Gewebe um die Gefäße ist nicht gefärbt. Der helle Bereich am linken unteren Bildrand ist Fluoreszenz vom Schädelknochen. Das Gefäß hat am unteren Bildrand einen Durchmesser von ca. 30 μm.Die Intensitätswerte des Originalbildes wurden mit 10 multipliziert.

In Abbildung 5.2 und Abbildung 5.3 sind Bilder dieser Messung gezeigt. Zunächst einmal fällt auf, daß die Gefäße im konventionellen Bild dunkel sind. Dies kann folgendermaßen erklärt werden. Auf die Kamera fällt das Infokuslicht, indem die Gefäße, wie in Abbildung 5.3 zu sehen, höhere Intensität als ihre Umgebung haben. Das die Umgebung nicht ganz dunkel ist kann an kleineren Gefäßen liegen, die nicht aufgelöst werden. Außerdem fällt auch noch das gestreute Fluoreszenzlicht auf die Kamera. Das Streulicht, das von unterhalb der Infokusebene kommt, wird in den Blutgefäßen vom Hämoglobin absorbiert. Wenn nun die Intensität der rückgestreuten Fluoreszenz größer als die der Fluoreszenz in den Gefäßen ist, können die großen Gefäße in der Summe dunkler erscheinen, wenn dort die gestreute Fluoreszenz deutlich stärker absorbiert wird als in der Umgebung. Das Emissionsmaximum von FITC ist bei ca. 530 nm, dort absorbiert kein Chromophor im Hirngewebe stärker als Hämoglobin (Mobley and Vo-Dinh 2003). Weiter unten wird die Messung mit Fluoreszenz bei einer anderen Wellenlänge wiederholt, um die Hypothese der Kontrastbildung durch Absorption zu überprüfen.

Der Vergleich der Bilder zeigt, daß in dem rechten oberen Viertel des Schnittbildes helle Strukturen zu sehen, die auch im konventionellen Bild wieder zu erkennen sind.

Da sie dort auftauchen, wo im konventionellen Bild die Gefäße scharf zu sehen sind, ist zu vermuten, daß es sich hierbei um Blutgefäße handelt. (Wegen der Dominanz der Absorption von Hämoglobin sind im konventionellen Bild die dunklen Strukturen als Orte hoher Blutkonzentration und damit die dünnen Strukturen als Gefäße zu identifizieren.) Gleichzeitig gibt es in den Schnittbildern eine dunkle Struktur, die im linken oberen Teil des Bildes vertikal verläuft und dann einen Bogen erst zur Mitte und dann nach unten macht. Diese ist auch im konventionellen Bild zu erkennen. Vermutlich ist dies ein nicht gefärbtes Blutgefäß.

Die Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5 zeigen Bilder von einer auf gleiche Weise präparierten Maus, deren Gefäße mit texas red Dextran (D1830, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) gefüllt sind. Als Anregungsfilter wurde ein 560BP55 (HQ Qualität, Chroma), als Emissionsfilter ein 645BP75 (HQ Qualität, Chroma) und als Strahlteiler ein Dichrolight R-65 (Linos Photonics) verwendet. Das Emissionsmaximum des Farbstoffs liegt bei ca. 625 nm. Dort absorbiert Hämoglobin mindestens 5-fach weniger als bei 530 nm (Abbildung 5.6). Die Gefäße sind hier auch im konventionellen Bild, das ohne strukturierte Beleuchtung aufgenommen wurde, heller als die Umgebung. Dies stützt die oben gegebene Erklärung dafür, daß bei Färbung mit FITC im konventionellen Bild die Gefäße dunkler als ihre Umgebung sind. Bei 625 nm absorbiert das Hämoglobin so viel schwächer, daß die gestreute Fluoreszenz nicht über die Infokusfluoreszenz dominiert. Die Fluoreszenz war recht schwach, so daß bei der Kamera ein Verstärkungsfaktor von 3 zugeschaltet wurde. Die Modulationsamplitude war dadurch auch sehr gering, so daß jeweils 1356 Schnittbilder gemittelt wurden, um die Gefäße sichtbar zu machen. Die Gefäßstruktur im Schnittbild läßt sich im konventionellen Bild gut wiedererkennen.

Die Messungen zeigen, daß die optische Schnittbildung mit strukturierter Beleuchtung auch *in vivo* durch den ausgedünnten Schädel möglich ist. Außerdem demonstriert die Messung mit FITC Dextran, daß die optische Schnittbildung nicht nur eine bessere Lokalisierung des Signalorts ermöglicht, sondern durch Beseitigung des Effekts von Außerfokuslicht auch Eigenschaften des Objekts sichtbar macht, die zuvor nicht sichtbar waren. In der Messung mit FITC Dextran war dies, daß die großen Gefäße heller als ihre laterale Umgebung sind, was in den konventionellen Bildern umgekehrt aussah. Dies zeigt, daß bei der Messung im Gehirn die konventionellen Weitfeldbilder, die eine Überlagerung von Infokus- und Außerfokuslicht wiedergeben, die dreidimensionale Intensitätsstruktur des Objekts falsch wiedergeben können, die mit optischer Schnittbildung durch strukturierte Beleuchtung deutlich besser wiedergegeben wird.



Abbildung 5.2: Konventionelles Weitfeldbild mit FITC-gefärbten Blutgefäßen. Das Bild wurde mit dem Summenalgorithmus erstellt.Der Anregungsfilter transmittierte bei 450 – 490 nm, das Maximum der Fluoreszenzemission bei 530 nm. Das Bild umfaßt ca. 1000 x 800 μm im Objekt.



 Abbildung 5.3: Weitfeldbild mit Schnittbildung, mit dem Demodulationsalgorithmus QD-AS aus Gl.
 (4.9) berechnet. Das mittlere Bild entspricht dem Bild in der obigen Abbildung. Die axiale Schrittweite zwischen den Bildern ist 40 μm. Es wurde keine Mittelung angewendet.



Abbildung 5.4: Konventionelles Weitfeldbild von Gefäßen, die mit texas red Dextran gefüllt sind.



Abbildung 5.5: Schnittbilder der mit texas red Dextran gefüllten Gefäße. Die Schnittilder wurden mit QD-AS berechnet. Die axiale Schrittweite zwischen den Bildern ist 27 µm. Es wurden jeweils 1356 Bilder gemittelt.



Abbildung 5.6: Extinktion von Oxy- und Deoxyhämoglobin. Bild aus <u>http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/index.html</u>.

5.2 Synaptische Stimulation *in vitro*

Für einen Test der Schnittbildung mit zeitabhängigen neurogenen Signalen in lebendem Gewebe wurde Messungen in sogenannten organotypischen oder auch kultivierten Hirnschnitten gemacht. Hirngewebe kann über einen Zeitraum von mehrerern Wochen am Leben gehalten werden, wenn es in Scheiben von ca. 500 µm geschnitten wird und danach in einer kontrollierten Umgebung (steril, geeignete Temperatur usw.) sowie in einer Nährlösung gehalten. Man sagt, das Gewebe wird "kultiviert". Da viele Eigenschaften des Gewebes erhalten bleiben, werden diese Kulturen "organotypisch" genannt (Gähwiler 2002). In dieser Arbeit wurde an Hirnschnitten gemessen die nach der in (Stoppini, Buchs et al. 1991) beschriebenen Methode kultiviert wurden. Die Hirnschnitte sind dabei auf einer porösen Membran aufgebracht, durch die sie mit der Nährlösung Kontakt haben. Für die Messung wird ein Stück der Membran mit dem Hirnschnitt ausgeschnitten und in eine Perfusionskammer gelegt. Dort wird der Hirnschnitt mit einer Elektrolytlösung (Ringerlösung "Electrophysiology Grade", Biometra, Göttingen, Deutschland) perfundiert, in der Kalziumglukose gelöst ist und die mit Sauerstoff begast wurde. Damit kann das Gewebe außerhalb der Kultur noch für Stunden am Leben gehalten werden. Die hier verwendeten Hirnschnitte stammen vom Hippocampus einer 7 Tage alten Ratte. Die Messung wurde 15 Tage nach Herstellung des Hirnschnittes gemacht. Zur elektrischen Stimulation der Neurone wird eine Glaselektrode in das Gewebe eingeführt, die mit 1 M Kochsalzlösung gefüllt ist. In dieser Glaselektrode befindet sich eine Drahtelektrode, im Perfusionsbad eine zweite. Da alle Lösungen eine hohe Ionenkonzentration enthalten, kann bei Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden ein Strom fließen, der die Neurone künstlich depolarisiert und so ein elektrisches Signal auslöst. Der Hippocampus ist ein Teil des Gehirns, in dem historisch vor allem die Langzeitverstärkung synaptischer Übertragung studiert wurde (Bliss and Lomo 1973), die möglicherweise der Gedächtnisbildung zugrunde liegt. Er enthält schon im Durchlichtmikroskop eine markante Struktur in Form eines gebogenen Pfeils, die die Orientierung für eine gezielte Stimulation erleichtert. Die künstliche Depolarisation durch die Elektroden wird synaptische Stimulation genannt. Der Ionenstrom depolarisiert die Schaffer'sche Kollaterale genannten Axone, so daß dort Aktionspotentiale (APs) erzeugt werden. Diese stimulieren postsynaptisch die Dendriten, in denen dann erregende postsynaptische Potentiale (EPSPs) und APs auftreten können. Diese sind von einem Kalziumeinstrom in die Zellen begleitet, und dieser Einstrom im Dendritenbaum wird hier beobachtet.

Der Hirnschnitt wurde mit einem kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Es wurde ein sogenannter Acetoxymethylesther-Farbstoff (AM-Esther-Farbstoff) verwendet. Dieser ist außerhalb der Zellen nicht fluoreszent, kann jedoch in die Zelle eindringen. Dort wird der Esther hydrolysiert und der Farbstoff wird fluoreszent (Tsien 1981). Auf diese Weise lassen sich Zellen färben, indem der AM-Esther-Farbstoff einfach auf das Gewebe aufgebracht wird. Als Farbstoff wurde Oregon Green BAPTA-1 AM (O6807, Molecular Probes) verwendet. Davon wurden 50 μ g in 4 mL Pluronic F-127 (Molecular Probes) und 20 μ L des Nährmediums der Hirnschnitte gelöst. Es wurden zuerst 8 μ L auf den Hirnschnitt gegeben, dann noch zwei mal nach jeweils 30 Minuten 6,5 μ L.

Beim Einführen der Elektrode wurden Stimulationspulse mit einer Frequenz von 2 Hz gegeben und der Spannungsabfall über einem 100 k Ω Widerstand nach der Badelektrode überwacht. Sobald die Elektrode Kontakt zum Hirnschnitt hat, sinkt die Spannung an der Badelektrode, da der Widerstand an der Stimulationselektrode steigt. Die Stimulationselektrode wurde dann noch 60 µm ins Gewebe eingeführt. Dann wurde 100 ms nach dem Beginn der Bildaufnahme eine Reihe 200 µs langer Stimulationspulse von -30V gegeben. Die Stimulationselektrode war im Bereich der Schaffer'schen Kollaterale positioniert.

Das Gitter war bei der Aufnahme so auf den Hirnschnitt fokussiert, daß im Kamerabild der Gitterkontrast möglichst groß erschien. Es wurde der gleiche Filtersatz wie bei der Messung mit FITC im vorigen Abschnitt verwendet. Wegen der relativ geringen Fluoreszenz war stets ein Verstärkungsfaktor 3 in der Kamera zugeschaltet.

Abbildung 5.7 zeigt das Signal auf einem Pixel im konventionellen und im Schnittbild nach 32-facher Mittelung aufeinander folgender Messungen. Es wurde nach 100, 300 und 500 ms stimuliert. Die Werte aus dem konventionellen Bild wurden so normiert, daß im Zeitraum vor dem Stimulus gleiche mittlere Helligkeit herrscht. Das Rauschen nach optischer Schnittbildung ist wesentlich größer, aber der im konventionellen Bild enthaltene Signalverlauf ist im Schnittbild auch zu erkennen. Das Signal-zu-Rausch Verhältnis ist nach Schnittbildung schlechter, das Δ F/F aber besser. Letzteres ist erklärbar, wenn man annimmt, daß das gesamte lebende Gewebe des Hirnschnitts durchgefärbt ist. Ein 15 Tage alter Hirnschnitt ist dünner als ein frischer Schnitt und hat eine Dicke von ca. 250 μ m. Auf der Oberfläche hat sich dann auch eine Schicht abgestorbener Zellen, die vielleicht zwei Zellschichten, also 20 μ m umfaßt, die von den AM-Esther-Farbstoffen nicht angefärbt wird. Um den maximalen Gitterkontrast zu sehen ist das Gitter sicher auch mindestens 20 μ m tief in den gefärbten Teil des Hirnschnitts fokussiert worden. Da die Stimulationselektrode 60 μ m unter der Oberfläche des Hirnschnitts platziert wurde und das Feld der Elektrode mit wachsendem Abstand schnell fällt, wird im Schnittbild mehr Licht aus dem Bereich enthalten sein, in dem es Fluoreszenzänderungen gibt als im konventionellen Bild.

Das Signal-zu-Rausch Verhältnis hat im Verglech zum konventionellen Weitfeldbild um den Faktor 17 abgenommen, was durch die geringe relative Modulationsamplitude zu erklären ist. Ein Vergleich des Signal-zu-Rausch Verhältnis mit einem quantitativen Modell wird im nächsten Kapitel gezogen. Das Rauschen vor dem Stimulus ist konsistent mit der Messung, die in Abbildung 4.15 gezeigt ist. Der Mittelwert der Modulationsamplitude vor dem Stimulus beträgt ca. 10370 ADU, also ohne Verstärkung ca. 3450 ADU. Aus Abbildung 4.15 ermittelt man dann eine Standardabweichung des Rauschens von 20 ADU, also mit Verstärkung bei den 10370 ADU von 60 ADU. Nach 32-facher Mittelung bleibt davon eine Standardabweichung von 10,6 ADU. Gemessen werden 10,83 ADU.



Abbildung 5.7: Signal auf einem Pixel im konventionellen Bild (rot) und im Schnittbild (blau).

Um das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu verbessern kann räumlich und zeitlich gemittelt werden In Abbildung 5.8 wurden in einem gleitenden Zeitfenster jeweils 3 aufeinanderfolgende Werte gemittelt; diese Mittelung wurde drei mal wiederholt. Die Signale aus dem Schnittbild sind etwas deutlicher zu sehen. Die gemittelten Bilder werden für die folgende Auswertung verwendet.

Abbildung 5.9 zeigt das für jeden Zeitwert berechnete $\Delta F/F$. Als F wurde der Mittelwert der Zeitreihe vor dem ersten Stimulus genommen. Gegenüber dem konventionellen Weitfeldbild wird ein mehr als doppelt so großes $\Delta F/F$ gemessen.



Abbildung 5.8: Nach zeitlicher Filterung ist im Schnittbild das Signal-zu-Rausch Verhältnis besser.



Abbildung 5.9: $\Delta F/F$ aus der Messung in Abbildung 5.8



Abbildung 5.10: Fluoreszenzverteilung im Hirnschnitt.

Wenn das Δ F/F auf jedem Pixel berechnet wird, kann daraus ein neues Bild erzeugt werden, daß die räumliche Signalstruktur zeigt. In Abbildung 5.11 und Abbildung 5.12 sind diese Δ F/F Bilder gezeigt. Bei gleicher Skalierung ist in den Schnittbildern die relative Helligkeitsänderung viel deutlicher zu sehen. Wegen des kleineren Rauschens zeigt eine angepaßte Skalierung im konventionellen Bild die Struktur der Helligkeitsänderung besser (Abbildung 5.13). Das maximale Δ F/F ist an der Elektrodenspitze.

Die Abbildung 5.14 zeigt das Signal auf einem Pixel bei 5 Stimuli und 100 ms Stimulationsabstand nach Mittelung von 32 aufeinander folgender Messungen. Das ΔF zwischen zwei Stimulationen wird dann zu klein, so daß das Signal-zu-Rausch Verhältnis nicht ausreicht, um die Signaländerung aufzulösen. Die Zeitreihe in Abbildung 5.15 entsteht durch die gleiche zeitliche Filterung wie Abbildung 5.8 (dreifache Filterung mit gleitendem Fenster) und zusätzlich einem räumlichen Median-Filter, der jedem Pixelwert den Median der umgebenden 3x3 Pixel zuweist.

 0.2

 0.15

 0.05

 0.05

 0.11

 0.05

 0.11

 0.05

 0.11

 0.05

 0.11

 0.15

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

 0.11

Abbildung 5.11: $\Delta F/F$ in den Schnittbildern. Die Skalierung ist in [%/100]. Im Bild links unten ist die Position der Stimulationselektrode gezeigt.



Abbildung 5.12: $\Delta F/F$ in den konventionellen Bildern bei gleicher Skalierung.

Die beiden ersten Signaländerungen werden dadurch sichtbar, die drei folgenden, die nahezu das gleiche Δ F/F haben, jedoch zumindest in ihrem Zeitverlauf nicht mehr. Hier ist eine höherere Anzahl von Mittelungen aufeinander folgender Messungen notwendig.



Abbildung 5.13: $\Delta F/F$ im konventionellen Bild mit angepaßter Skalierung.



Abbildung 5.14: Signal auf einen Pixel bei 100 ms Stimulationsabstand



Abbildung 5.15: 100 ms Stimulationsabstand und räumlich-zeitliche Filterung.

6 Limitationen für die Anwendung der strukturierten Beleuchtung im Gehirn

Was die in Kapitel 3 beschriebene Implementierung der Weitfeldmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung leisten kann wurde in Charakrerisierungsmessungen in Kapitel 4 und für lebendes Gewebe exemplarisch in Kapitel 5 demonstriert. Hier sollen die Limitationen bei der Anwendung im Gehirn zusammengefaßt werden. Außerdem soll diskutiert werden, ob und in welcher Hinsicht noch bessere Ergebnisse erzielt werden können. Damit soll die Diskussion der Anwendung im Gehirn aus Abschnitt 2.3 nach den Messungen aus Kapitel 4 und 5 wieder aufgenommen und um die Erfahrungen aus diesen Messungen erweitert werden.

6.1 Signal-zu-Rausch Verhältnis

Wenn die optische Mikroskopie nur zur Abbildung räumlicher Strukturen verwendet wird, werden als maßgeblich interessanten Eigenschaften in der Regel räumliche Auflösung und Kontrast dieser Strukturen diskutiert. Dies ist hier auch von Bedeutung, zusätzlich Anforderung aber mit der zur Auflösung zeitabhängiger Intensitätsänderungen, den funktionellen Signalen, verbunden. Als maßgebliche Größe wurde dafür in Abschnitt 2.3 das Signal-zu-Rausch Verhältnis dargestellt. Im Vergleich zum konventionellen Weitfeldmikroskop wird das Signal-zu-Rausch Verhältnis durch die relative Modulationsamplitude bestimmt; die Modulationsamplitude bestimmt die rekonstruierte Signalstärke und der Mittelwert der Modulation das Rauschen. Die relative Modulationsamplitude wird durch Streuung und Außerfokuslicht reduziert sowie, im Falle von Saturation der Kamera, durch die zu reduzierende Anregungsintensität. Im Gehirn macht sich zusätzlich bemerkbar, daß das einzelne funktionelle Signal, also eine Änderung der lokalen Ionenkonzentration, auf einen Bereich begrenzt ist, der in der Regel außerhalb der Auflösung des optischen Systems ist und die optischen Indikatoren, die zur Messung verwendet werden, auch nicht einzelne solche Ereignisse markieren. Das gemessene Signal stellt daher fast immer eine Mittelung über viele funktionelle Signale in einzelnen Zellen dar. Da diese meist nicht zeitlich synchron sind, reduziert das die Signalstärke bereits. Wenn es zusätzlich noch nicht möglich ist, ausschließlich die funktionellen Einheiten, deren Signal hauptsächlich untersucht werden soll (z.B. bestimmte Neurone oder funktionelle Neuronenverbände), gezielt zu markieren (anzufärben), steigt dadurch das Rauschen, ohne das das eigentliche Signal größer wird. In dem hier verwendeten Aufbau wurde eine laterale Auflösung von 13 µm (Pixelgröße im Objekt) und eine optische Schnittdicke von 90 µm (FWHM) erreicht. Zusätzlich zur Begrenzung durch die relative Modulationsamplitude werden die gemessenen funktionellen Signale über diesen Bereich gemittelt.

Um den Einfluß verschiedener Parameter, die das Signal-zu-Rausch Verhältnis beeinflussen, zu quantifizieren wird nun ein Modell für das Signal-zu-Rausch Verhältnis entwickelt.

In Abbildung 6.1 ist das Signal auf einem Pixel des Kamerachips gezeichnet. Im Modell soll das Signal-zu-Rausch Verhältnis (SNR) bei strukturierter Beleuchtung mit dem im konventionellen Weitfeldbild verglichen werden. Dazu wird zunächst das Verhältnis des SNR bei 100 % MA (H = 0, MA=F_{max}, F_{mittel}=(1/2)F_{max}) berechnet. Es wird angenommen, daß das Rauschen vom Schrotrauschen dominiert ist. Dann ist das Rauschen mit strukturierter Beleuchtung $\sqrt{F_{mittel}}$, außerdem wird die Amplitude des Rauschens nach Demodulation durch QD-AS um den Faktor $\sqrt{2/3}$ verringert. Damit ist

$$SNR_{strukt.Bel.,max} = \frac{\Delta F}{\sqrt{F_{mittel}}} \sqrt{\frac{3}{2}}$$
 (6.1)

Bei 100 % MA wird der Träger nur einseitig moduliert, in den dunklen Streifen ist ja F = 0, was sich auch während des funktionellen Signals nicht ändert. Daher ist das ΔF in diesem Fall nicht so groß wie bei F_{max} , sondern wie bei F_{mittel} . Zum Vergleich wird das SNR in einem Bild herangezogen, in dem die gleiche Photonenzahl detektiert wurde. In diesem Bild herrscht die Intensität F_{mittel} . Das ΔF skaliert, wie bei der strukturierten Beleuchtung, mit F_{mittel} . Bei der Demodulation werden aber 3 Bilder zur Gewinnung eines Schnittbildes verwendet. Diese können im Fall des konventionellen Weitfeldbildes gemittelt werden, so daß das SNR im konventionellen Bild mit gleicher Photonenzahl

$$SNR_{k,3} = \frac{\Delta F}{\sqrt{F_{mittel}}} \sqrt{3}$$
(6.2)

ist. Es gilt also

$$SNR_{strukt.Bel.,max} = \frac{1}{\sqrt{2}} SNR_{k,3}$$
(6.3)



Abbildung 6.1: Kenngrößen der Modulation. Die maximale Intensität F_{max} ist die Summe aus dem Hintergrund H und der Modulationsamplitude MA.

Unter experimentellen Bedingungen ist MA < F_{max} durch die Detektion auf dem Kamerachip, Streuung und Außerfokuslicht (siehe Kapitel 5). Dann skaliert das SNR im Vergleich zum konventionellen Bild zusätzlich mit der relativen MA, denn das ΔF skaliert mit der MA, und das Außerfokuslicht trägt nur zum Rauschen, aber nicht zum Signal bei:

$$SNR_{strukt.Bel.} = \frac{1}{\sqrt{2}} SNR_{k,3} \frac{MA}{F_{\max,IF} + H}$$
(6.4)

mit

$$MA = MA_{ini} \cdot F_{\max,IF} \left(e^{-2\frac{z}{l_s}} + \left(1 - e^{-2\frac{z}{l_s}}\right) \left(G_{streu,\max} - G_{streu,\min}\right) \right)$$

$$G_{streu} \int_{-\infty}^{\infty} f(r,k) BSF(\sigma,k) dr \qquad (6.5)$$

$$f(r,k) = \left(\frac{1}{2} + \frac{2}{\pi} \left(\sin kr + \frac{1}{3}\sin 3kr + \frac{1}{5}\sin 5kr\right)\right)$$

wobei MA_{ini} die mit dem Kamerachip auf der dünnen fluoreszenten Schicht gemessene Modulationsamplitude, also ohne Streuung und Außerfokuslicht, und $F_{max,IF}$ die maximale Intensität im Infokusbereich ist. Die BSF ist die in Abschnitt 4.1.6 definierte

beam spread function, die als Gaußfunktion mit der Varianz $\sigma^2 = \frac{2}{3} \frac{z^3}{l_s} (1-g)$

angenommen wurde.

Anhand dieser Funktion kann das SNR bei den Messungen im Hirnschnitt aus dem vorigen Kapitel erklärt werden. Hier ist MA_{ini} = 0.56, siehe Abschnitt 4.1. Der Außerfokusbereich des Hirnschnitts ist ungefähr so groß oder etwas größer als die Schnittbreite, und da der Hirnschnitt nur 200-250 µm dick ist, kann er als homogen gefärbt angenommen werden. Da aber die Messung impliziert, daß der größere Teil des Signals aus der Schnittdicke kommt, wurde $H = 0.5^* F_{max,IF}$ angenommen. In (Oheim, Beaurepaire et al. 2001) wurde die Streulänge im Hirn von Ratten in vitro und in vivo bei einer Wellenlänge von 800 nm gemessen. Dort wurde eine Streulänge von 87 µm für 14 bis 18 Tage alte Ratten bestimmt, was ungefähr dem Alter der Ratte entspricht, aus der der Hirnschnitt für die Messung in Kapitel 6 gewonnen wurde. In (Yaroslavsky, Schulze et al. 2002) wurde im Bereich von 450 – 670 nm gemessen, allerdings in totem Hirngewebe, so daß die absoluten Werte nicht einfach übertragbar sind. Die Änderung der Streulänge mit der Wellenlänge sollte aber näherungsweise übertragbar sein; dort findet sich, daß sich die Streulänge mit dem gleichen Faktor wie die Wellenlänge ändert. Dies angenommen ergibt sich bei den im Hirnschnitt verwendeten 470 nm eine Streulänge von 51 µm. In Abbildung 6.2 ist der Quotient SNR_{strukt,Bel}/SNR_{k,3} gegen die Fokustiefe aufgetragen. In Kapitel 6 wurde das relative SNR in der Messung im Hirnschnitt zu $1/17 \approx 0,059$ bestimmt. Dieser Wert entspricht einer Fokustiefe von ca. 40 µm. In Kapitel 6 wurde die Fokustiefe mit 40 µm abgeschätzt. Obwohl die Fokustiefe und die Dicke der Schicht abgestorbener Zellen auf dem Hirnschnitt nicht genau bekannt sind, trifft die Erwartung aus dem Modell den Meßwert sehr gut.



Abbildung 6.2: Das Signal-zu-Rausch Verhältnis bei $MA_{ini}=0.56$, $H=0.5*F_{max,IF}$ und 51 µm Streulänge. Aufgetragen ist die Fokustiefe gegen $SNR_{strukt,Bel} / SNR_{k,3}$.
Mit diesem Modell läßt sich nun auch diskutieren, wie das SNR für Messungen in vivo verbessert werden kann. Drei Parameter können beenflußt werden: Die Streulänge, MA_{ini} und die Außerfokusintensität auf einem Pixel H. In (Oheim, Beaurepaire et al. 2001) wurde bei 800 nm *in vivo* eine doppelt so große Streulänge wie *in vitro* gemessen, d.h. es ist zu ewarten, daß die MA in vivo langsamer abnimmt als im Hirnschnitt. Gleichzeitig ist die Streulänge bei höheren Wellenlänge größer, so daß eine Messung mit längerwelligem Anregungslicht von Vorteil für das SNR ist. Da dann auch die Artefakte aufgrund der Absorption duch Hämoglobin abnehmen, werden auch zunehmend Farbstoffe für die funktionelle Hirnabbildung entwickelt, die im längerwelligen Bereich absorbieren (Shoham, Glaser et al. 1999). Das SNR wird hier als Beispiel bei 630 nm Anregungswellenlänge ausgewertet. Wenn wieder von 87 µm Streulänge bei 800 nm im Hirnschnitt ausgehend skaliert wird, und die Streulänge in vivo als doppelt so groß wie im Hirnschnitt angenommen wird, ergibt sich bei 630 nm eine Streulänge von 136 µm. In Abbildung 6.3 ist das SNR bei dieser Streulänge und MA_{ini} dargestellt. Das SNR wäre bei gleicher Eindringtiefe wie im Hirnschnitt schon um einen Faktor 8,7 gegen die Messung im Hirnschnitt verbessert Wenn nun so ins Gewebe fokussiert wird, daß die Halbwertsbreite der Schnittdicke gerade ganz im Gewebe liegt, also 45 µm tief, ist das SNR auch nur noch um den Faktor 7,7 schlechter als im konventionellen Weitfeldbild.



Abbildung 6.3: $SNR_{strukt.Bel.} / SNR_{k,3}$ bei einer Streulänge von 136µm und $MA_{ini} = 0,56$ (schwarze Punkte) sowie $MA_{ini} = 0.8$ (rote Punkte). Das SNR ist gegenüber der Abbildung 6.2 bei einer Tiefe von 45 µm um einen Faktor 8,7 bzw. 12 verbessert. Es wurde $H = F_{max.IF}$ gesetzt.

Die Modulationsamplitude auf der fluoreszenten Ebene MA_{ini} kann nach der Darstellung in Abschnitt 5.1 durch breitere Gitterstreifen erhöht werden. Mit dem dort

beschriebenenen Modell errechnet man, daß bei 7 Pixeln pro Gitterperiode MA_{ini} auf 0,8 statt 0,56 verbessert werden kann. Die optische Schnittdicke steigt dann von 90 auf 130 µm an. Da aber die tieferen Ausläufer der axialen Antwort durch Streuung noch zusätzlich abgeschwächt werden, ändert sich die Schnittdicke effektiv kaum, so daß auch wieder der Vergleich bei einer Fokussierung in 45 µm Tiefe gezogen werden kann. In diesem Fall ist das SNR nur noch einen Faktor 5,6 schlechter als im konventionellen Weitfeldbild. In der gleichen Eindringtiefe wie im Hirnschnitt wäre das SNR sogar um einen Faktor 12 gegen die Messung im Hirnschnitt verbessert. In der bisherigen Diskussion wurde H = 1 angenommen. Dies muß in vivo nicht erfüllt sein; wenn das Gehirn auch bis in tiefere Schichten durchgehend gefärbt ist, kann H > 1 sein. Das SNR ist aber trotz der diskutierten Verbesserungen nur in der obersten Hirnschicht nicht wesentlich geringer als im konventionellen Weitfeldbild, so daß Messungen auch hauptsächlich in dieser Schicht sinnvoll sind. Wenn also ohnehin nur die Aussage getroffen wird, ob die funktionellen Signale aus den oberen 90 - 100 µm kommen, gewinnt man durch die Färbung aller anderen Schichten auch keine Information für die Schnittbildung. Eine Färbung in nur einer oder zwei weiteren Schichten, in denen dann parallel zur oberen Schicht gemessen werden kann, wäre also erstrebenswert. Zu beachten ist hier auch immer, daß ein konventionelles Weitfeldbild bei gleicher mittlerer Photonenzahl angenommen wurde, in dem schon drei man gemittelt ist.

In den Messungen in Hirngewebe war das Signal-zu-Rausch Verhältnis deutlich schlechter als im konventionellen Weitfeldbild. Das Signal ist dabei jedoch durch die Schnittbildung sicher einer bestimmten Tiefe (der Schnittbreite) zuzuordnen. Dies machte sich in den Messungen in organotypischen Hirnschnitten durch das bessere $\Delta F/F$ bemerkbar. Wenn das Signal-zu-Rausch Verhältnis also für das Sichtbarmachen eines funktionellen Signals hinreicht, machen sich die Vorteile der optischen Schnittbildung (Tiefenauflösung, geringere ,intrinsische' Mittelung) bemerkbar.

6.2 Fluoreszenz

Bei der Fluoreszenz würden Veränderungen in zwei Bereichen vorteilhaft für die Anwendung der strukturierten Beleuchtung sein können. Der eine Bereich betrifft Eigenschaften des Fluorophors im Gewebe, also die biologische Methodenentwicklung. Von den verschiedenen Hirnpräparationen und verschiedenen Färbetechniken wurden für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit solche herausgesucht, bei denen eine sehr hohe Fluorophorkonzentration im Gewebe erreicht werden kann. Bei vielen Anwendungen wäre die Fluoreszenzintensität bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 1 ms pro Bild nur sehr gering gewesen. Da die Kodierung des Signals in der Amplitude der Modulation schon eine Reduktion der Zeitauflösung mir sich bringt, war aber eine Verringerung der Bildrate nicht erwünscht. wesentliche Eine höhere Fluorophorkonzentration im Gewebe z.B. bei genetisch exprimierten Ionenindikatoren würde die Zahl möglicher Anwendungen erhöhen. Eine andere Vorteil wäre, wenn die Sensitivität der Farbstoffe für das Indikans, also das ΔF und damit das Signal-zu-Rausch Verhältnis verbessert würde. Auch eine selektivere Färbung der zu untersuchenden funktionellen Einheiten würde das Signal-zu-Rausch Verhältnis verbessern. Im Extremfall würde es natürlich auch optische Schnittbildung überflüssig machen, wenn schon durch die Färbung bekannt wäre, woher das funktionelle Signal stammt. Alle die erwähnten Punkte sind Gegenstand der Forschung bei der Entwicklung optischer Marker im Gehirn, so daß dort in Zukunft auch Fortschritte zu erwarten sind.

Einige Änderungen in der Implementierung würden die Fluoreszenzanregung und -detektion verbessern, bringen aber z.T. andere Nachteile mit sich. Ein Objektiv mit größerer numerischer Apertur bei der Detektion sammelt mehr Fluoreszenz, so daß über eine größere relative Modulationsamplitude das Signal-zu-Rausch besser wird. In Kapitel 4 wurde aber schon diskutiert, daß dies auf Kosten eines kleineren Bildfeldes geht. Einfacher wäre, eine Kamera mit höherer Quanteneffizienz bei der Fluoreszenzdetektion zu verwenden. Eine solche wurde getestet, konnte aber aufgrund technischer Probleme nicht eingesetzt werden. Bei den Messungen wurde kein signifikantes Bleichen des Farbstoffes beobachtet, so daß auch eine höhere Anregungsintensität in Frage kommt. Es wurde keine Weißlichtquelle mit höherer Leuchtdichte als die verwendete gefunden. Die Anregung mit diffus gemachtem Laserlicht wurde für die strukturierte Beleuchtung bereits beschrieben (Neil, Squire et 2000). Man würde dabei freilich die Flexibilität im Wechsel al. der Anregungswellenlänge verlieren und eventuell Probleme mit Laserspeckeln bekommen.

6.3 Eindringtiefe

Bei Fokussierung in das Hirngewebe nimmt die Modulationsamplitude zumindest durch Streuung ab, nach dem Modell in Kapitel 4 nach ca. einer Streulänge sogar exponentiell. Damit ist für ein gegebenes ΔF berechenbar, ab welcher Tiefe das Signalzu-Rausch Verhältnis in einer Einzelmessung nicht mehr ausreicht, um das Signal zu sehen, so daß gemittelt werden muss. Für das Mitteln sind zwei Eigenschaften des Rauschens wichtig. Zum einen muß es eine um seinen Mittelwert symmetrische Verteilung haben, damit das Ergebnis beim Mitteln nicht verfälscht wird. In Kapitel 4 wurde dies für das Rauschen der Kamera geprüft, und in Kapitel 3, daß dies auch bei der Demodulation durch QD-AS erhalten bleibt. Zum anderen muß die Digitalisierung in der Kamera so viele Stufen umfassen, daß das Rauschen mehrere ADU umfaßt. Dann kann bei der Mittelung eine sub-ADU Genauigkeit erzielt werden. Dies ist ab der Tiefe von Bedeutung, ab der die Modulationsamplitude so gering ist, daß das ΔF weniger als 1 ADU beträgt. Ohne Rauschen wäre dieses ΔF nicht mehr detektierbar. Die Verschiebung des Mittelwerts des Rauschens ist aber immer noch detektierbar, wenn das Rauschen mehrere ADU beträgt. Der Mittelwert kann ja jeden gebrochenzahligen Wert annehmen und ist, hinreichend großes Rauschen vorausgesetzt, nicht an die Digitalisierungsstufen gebunden. In Abbildung 4.13 ist ersichtlich, daß das Rauschen der Kamera immer genug ADU umfaßt. Damit ist in diesem Aufbau die Eindringtiefe durch die Digitalisierung nicht fundamental begrenzt. Durch hinreichend viele Mittelungen kann auch bei sehr kleiner Modulationsamplitude die demodulierte Amplitude immer rekonstruiert werden. Bei exponentieller Abnahme der Modulationsamplitude steigt allerdings auch die notwendige Anzahl von Mittelungen exponentiell an, sogar mit doppeltem Exponenten.

Prinzipiell kommen drei Arten von Mittelungen in Frage. Bei der räumlichen Mittelungen werden benachbarte Pixel gemittelt, was die räumliche Auflösung reduziert. Bei der zeitlichen Mittelung werden aufeinander folgende Werte gemittelt, was die zeitliche Auflösung reduziert. Bei der episodischen Mittelung werden aufeinander folgende Messungen gemttelt, was voraussetzt, daß das die Signale synchron zueinander sind. Ein Verlust an Information durch die Mittelung ist also unvermeidlich, bzw. es wird eine gewisse Vorannahme über die Form der Signale gemacht, wenn man sich für eine bestimmte Art zu Mitteln entscheidet. Auch bei einer Verbesserung des SNR wie eben diskutiert wird man bei den zu erwartenden funktionellen Signalen auf Mitteln nicht verzichten können..

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Verwendung von Weitfeldmikroskopie bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen optischen Methoden wie der Laserscanning-Mikroskopie, die bei der funktionellen Hirnabbildung verwendet werden. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch die sehr eingeschränkte Tiefendiskriminierung funktioneller Signale. Aufgabe dieser Arbeit war, die optische Schnittbildung in der Weitfeldmikroskopie durch strukturierte Beleuchtung auf funktionelle Hirnabbildung anzuwenden.

Eine Analyse der bisher vorgeschlagenen Implementierungen der strukturierten Beleuchtung einschließlich der Algorithmen zur Gewinnung des Infokussignals zeigten, daß diese für die Anwendung auf funktionelle Signale im Gehirn in wesentlichen Punkten untauglich sind. In bisherigen Anwendungen wurde eine dem konfokalen Mikroskop vergleichbare Auflösung angestrebt. Da aber in der Weitfeldmikroskopie das Hintergrundlicht nicht ausgeblendet wird, trägt es auch nach Schnittbildung zum Rauschen bei. Im Gehirn ist aber ein hoher Anteil an Außerfokuslicht zu erwarten, so daß eine Schnittbreite deutlich über der eines Laserscanningmikroskops angestrebt wurde.

Das optische System sollte dem Rechnung tragen und ein ähnlich großes Bildfeld wie bei dem für die Hirnabbildung oft verwendeten Tandem-Linsen-Makroskop besitzen. Daher wurden zunächst eine Kombination aus zwei Makroskopen als abbildendes System entworfen. Damit ließ sich ein durch die Größe des Kamerachips limitiertes Bildfeld von 1,08 x 0,79 mm erreichen, in dem das Gitter auch durch die Pixel des Kamerachips noch hinreichend oft abgetastet wird. Mit diesem Aufbau wurde eine optische Schnittbreite von 90 μ m gemessen, die ausreicht, funktionelle Signale verschiedenen Schichten der vertikale Schichtstruktur des Kortex einer Ratte zuzuweisen. Die durch die Pixelgröße definierte laterale Auflösung liegt bei 12 x 13 μ m.

Es war zu erwarten, daß die auftretenden Signale eine geringe Intensitätsänderung von unter 1 % zeigen und eine zeitliche Auflösung von deutlich über 100 Hz notwendig ist, um auch die Änderungen der schnelleren Signale korrekt reproduzieren zu können. Im konventionellen Weitfeldmikroskop würde dies durch ausreichende Signalintensität sowie genügende Elektronenspeicherkapazität und Bildrate der Kamera gewährleistet. In der strukturierten Beleuchtung muß das optische Schnittbild durch einen Algorithmus rekonstruiert werden. Bei dem in anderen Anwendungen verwendeten Algorithmus war die Fehleranfälligkeit für die zu erwartenden Signale zu groß, so daß ein neuer entwickelt wurde, der auf Demodulationsverfahren Algorithmus aus der Signalverarbeitung in der Kommunikationtheorie basiert. Gleichzeitig wurde ein phasenstarrer Regelkreis für die Bewegung des Gitters implementiert, der sicherstellt, daß die Positionierfehler des Gitters innerhalb der Toleranz des Demodulationsverfahrens bleiben.

In verschiedenen Messungen wurde nun die Schnittbildung durch strukturierte Beleuchtung für die speziellen Bedingungen im Gehirn getestet. Die Messung in einem Gewebephantom zeigte, daß durch die optische Schnittbildung nicht nur der Ort eines Signals genauer aufzulösen ist, sondern auch das Außerfokuslicht deutlich unterdrückt wird. Da auch die Intensitätsänderungen vergleichsweise lokalisierter Außerfokussignale bei konventioneller Weitfeldmikroskopie noch zum Signal auf einem Pixel beitragen, kann damit auch die Intensitätsänderung durch ein funktionelles Signal besser einer bestimmten Signalquelle zugeordnet werden.

Als maßgeblich schwierig für die Beobachtung funktioneller Signale im Gehirn durch strukturierte Beleuchtung erwies sich das Signal-zu-Rausch Verhältnis. Es wird wesentlich durch die relative Modulationsamplitude des Infokussignals bestimmt. Diese wird jedoch durch Streuung und Außerfokuslicht reduziert. Das Außerfokuslicht wird zwar durch die Demodulation beseitigt, aber nicht sein Beitrag zum Rauschen. Wenn das Gehirn bis in eine Tiefe von mehreren hundert Mikrometern gefärbt ist, weil in verschiedenen Tiefen gemessen werden soll, überwiegt der Anteil des Außerfokuslichts bei einer Schnittbreite von 90 µm gegenüber dem Anteil im optischen Schnitt. Hier macht sich auch bemerkbar, daß die Intensitätsänderungen durch funktionelle Signale oft klein sind, da die enge Anordnung von Neuronen im Gehirn bedingt, daß im Beobachtungsvolumen bereits viele asynchrone funktionelle Prozesse (Ionenflüsse durch Membrankanäle) stattfinden, die in der Summe nur zu einer geringen Intensitätsänderung führen. Diese ist dann aber in viel höherem Maße in aufeinander folgenden Messungen synchron, so daß eine Mittelung solcher Messungen möglich wird.

Der Einfluß der Streuung auf die Modulationsamplitude wurde modelliert und experimentell bestätigt. Das Modell sagt aus, daß ab einer Eindringtiefe von ca. 1 mittleren freien Weglänge des Lichts das Bild des Gitters fast ausschließlich von ungestreutem Licht gebildet wird. Die Modulationsamplitude und damit auch das Signal-zu-Rausch Verhältnis nimmt daher in dem Wellenlängenbereich, in dem die meisten Farbstoffe zur Verfügung stehen, ab einer Tiefe von 70 – 130 µm mit $\exp[-2 \cdot z/l_s]$ ab (z: Eindringtiefe, l_s : Streulänge).

Es wurden zwei Typen von Messungen in lebendem Gewebe durchgeführt. Zum einen wurde die Morphologie oberflächennaher Blutgefäße einer Maus *in vivo* rekonstruiert, die zusätzlich zum Blut mit einem Farbstoff gefüllt waren. Hier zeigte sich, daß die Intensitäten von Strukturen wie der Gefäße im Verhältnis zur Umgebung im konventionellen Weitfeldbild falsch wiedergegeben werden können. Im optischen Schnittbild hingegen sind die Intensitätsverhältnisse durch Beseitigung des gestreuten Außerfokuslichts korrekt abgebildet. Bei einer Messung von elektrisch stimulierten Zellen im Hirnschnitt des Hippocampus einer Ratte *in vitro* zeigte sich im Vergleich zum konventionellen Weitfeldbild, daß der Signalverlauf im Schnittbild richtig

rekonstruiert wurde, das Signal-zu-Rausch Verhältnis aber deutlich schlechter war. Die relative Intensitätsänderung durch das funktionelle Signal am Ort der Stimulation wurde aber als größer gemessen. In beiden Fällen erwiesen sich also Informationen wie Kontrast einer Struktur oder Stärke eines Signals in einer bestimmten Tiefe als verschieden von dem, was das konventionelle Weitfeldbild bei Fokussierung in die gleiche Tiefe ergab. Dies unterstreicht die Bedeutung der optischen Schnittbildung im Gehirn nicht nur für eine bessere Lokalisierung sondern auch für eine korrekte Abbildung funktioneller Signale.

Die wesentliche Beeinträchtigung bei der Schnittbildung durch strukturierte Beleuchtung im Gehirn ist das reduzierte Signal-zu-Rausch Verhältnis. Durch verschiedene Arten von Mittelungen kann das Signal-zu-Rausch Verhältnis verbessert werden. Das Modell, welches das Signal-zu-Rausch Verhältnis bei der Messung im Hirnschnitt richtig wiedergibt, sagt vorher, daß durch die Wahl einer 1,35-fach höheren Wellenlänge und 1,56-fach breiterer Gitterstreifen das Signal-zu-Rausch Verhältnis *in vivo* im Vergleich zur Messung *in vitro* um mehr als eine Größenordnung gesteigert werden kann. Es müßte nach der Vorhersage dieses Modells bei einer Messung in der obersten Hirnschicht auch nur ungefähr doppelt so häufig gemittelt werden wie in einer Messung, die im konventionellen Weitfeldmikroskop bei gleicher detektierter Photonenzahl ein ausreichendes Signal-zu-Rausch Verhältnis ergibt. Damit wäre das Signal-zu-Rausch Verhältnis zumindest für eine Schnittbildung in der obersten Hirnschicht so zu verbessern, daß eine Anwendung der strukturierten Beleuchtung sinnvoll ist.

Zusammenfassung und Ausblick

Literatur

Berger, M. (2001). Grundkurs der Regelungstechnik. Hamburg, Books on Demand.

- Bliss, T. V. P. and T. Lomo (1973). "Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in Dentate Area of Anesthetized Rabbit Following Stimulation of Perforant Path." <u>Journal of Physiology-London</u> 232(2): 331-356.
- Boreman, G. D. (2001). <u>Modulation Transfer Function in optical and electro-optical</u> <u>systems</u> Bellingham, Washington, SPIE Press.
- Carlson, A. B., P. B. Crilly, et al. (2002). <u>Communication Systems</u>. New York, McGraw-Hill.
- Cole, M. J., J. Siegel, et al. (2001). "Time-domain whole-field fluorescence lifetime imaging with optical sectioning." <u>Journal of Microscopy (Oxford)</u> 203(Part 3): 246-257.
- Das, B. B., F. Liu, et al. (1997). "Time-resolved fluorescence and photon migration studies in biomedical and model random media." <u>Reports on Progress in Physics</u> **60**(2): 227-292.
- Denk, W., J. H. Strickler, et al. (1990). "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy." <u>Science</u> 248(4951): 73-6.
- Duffieux, P. M. (1983). <u>The Fourier Transform and Its Applications to Optics</u>. New York, John Wiley & Sons.
- Dunsby, C. and P. M. W. French (2003). "Techniques for depth-resolved imaging through turbid media including coherence-gated imaging." Journal of Physics D-Applied Physics **36**(14): R207-R227.
- Dunsby, C., Y. Gu, et al. (2003). "High-speed depth-sectioned wide-field imaging using low- coherence photorefractive holographic microscopy." <u>Optics</u> <u>Communications</u> 219(1-6): 87-99.
- Elson, D. S., J. Siegel, et al. (2002). "Wide-field fluorescence lifetime imaging with optical sectioning and spectral resolution applied to biological samples." Journal of Modern Optics **49**(5-6): 985-995.

- Erhardt, A., G. Zinser, et al. (1985). "Reconstructing 3-D Light-Microscopic Images by Digital Image-Processing." <u>Applied Optics</u> 24(2): 194-200.
- Fisher, J. A. N., E. F. Civillico, et al. (2004). "In vivo fluorescence microscopy of neuronal activity in three dimensions by use of voltage-sensitive dyes." <u>Optics</u> <u>Letters</u> **29**(1): 71-73.
- Gabor, D. (1946). "Theory of communication." J. IEE 93: 429-457.
- Gähwiler, B. H. (2002). Organotypic Slice Cultures of Neural Tissue. <u>Culturing Nerve</u> <u>Cells</u>. G. G. Banker, K. Cambridge, Massachusetts, MIT Press: 461-498.
- Goodman, J. W. (1996). Introduction to Fourier Optics. Maidenhead, McGraw-Hill.
- Grinvald, A., D. Shoham, et al. (1999). In-vivo Optical Imaging of Cortical Architecture and Dynamics. <u>Modern Techniques in Neuroscience Research</u>. U. Windhorst. Berlin, Springer.
- Grinvald, A., R. D. Frostig, et al. (1988). "Optical Imaging of Neuronal-Activity." <u>Physiological Reviews</u> 68(4): 1285-1366.
- Gu, Y., Z. Ansari, et al. (2002). "High-speed 3D imaging using photorefractive holography with novel low-coherence interferometers." <u>Journal of Modern Optics</u> 49(5-6): 877-887.
- Hahn, S. L. (1996). Hilbert Transforms in Signal Processing. Norwood, Artech House.
- Hecht, E. (2002). Optics. 4th edition. San Francisco, Addison Wesley.
- Henyey, L. C. and J. L. Greenstein (1941). "Diffuse Radiation in the Galaxy." <u>Astrophysics Journal</u> 93: 70-83.
- Hilbert, D. (1912). <u>Grundzüge einer allgemeinen Theorie der linearen</u> <u>Integralgleichungen</u>. Leipzig.
- Holmes, T. J., S. Bhattacharyya, et al. (1995). Light Microscopic Images Reconstructed by Maximum Likelihood Deconvolution. <u>Handbook of Biological Confocal</u> <u>Microscopy</u>. J. B. Pawley. New York, Plenum Press.
- Hopkins, H. H. (1955). "The frequency response of a defocused optical system." <u>Proc.</u> <u>Roy. Soc. A</u> 231: 91-103.
- Ichikawa, M., T. Iijima, et al. (1993). Real-time Optical Recording of Neuronal Activities in the Brain. <u>Brain Mechanisms of Perception and Memory</u>. T. Ono, L. Squire, M. Raichle, D. Perret and M. Fukuda. New York, Oxford University Press: 638-648.

- Jackson, J. D. (1999). <u>Classical Electrodynamics</u>. 3rd edition. New York, John Wiley & Sons.
- Jonkman, J. E. N., J. Swoger, et al. (2003). "Resolution in optical microscopy." <u>Biophotonics, Pt A</u> **360**: 416-446.
- Juskaitis, R., T. Wilson, et al. (1996). "Efficient Real-Time Confocal Microscopy with White Light Sources." <u>Nature</u> **383**(6603): 804-806.
- Kandel, E., J. H. Schwartz, et al. (2000). <u>Principles of neural science</u>. New York, McGraw Hill.
- Karadaglic, D., R. Juskaitis, et al. (2002). "Confocal endoscopy via structured illumination." <u>Scanning</u> **24**(6): 301-304.
- Kleinfeld, D., P. P. Mitra, et al. (1998). "Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **95**(26): 15741-15746.
- Köhler, A. (1893). "Ein neues Beleuchtungsverfahren fuer mikrophotographische Zwecke." Z. Wiss. Mikrosk. 10: 433-440.
- Koester, C. J. (1995). Comparison of Various Optical Sectioning Methods. <u>Handbook of</u> <u>Biological Confocal Microscopy</u>. J. B. Pawley. New York, Plenum Press.
- Lagerholm, B. C., S. Vanni, et al. (2003). "Cytomechanics applications of optical sectioning microscopy [Review] Marriott G, Parker I." <u>Biophotonics, Pt B</u> Methods Enzymol. 175-197. 2003 . Academic Press.
- Lanni, F. and G. J. Baxter (1992). "Sampling theorem for square-pixel image data." <u>Proceedings of SPIE</u> 1660: 140-147.
- Lanni, F. and T. Wilson (2000). Grating Image Systems for Optical Sectioning Fluorescence Microscopy of Cells, Tissues, and Small Organisms. <u>Imaging</u> <u>Neurons</u>. R. Yuste, F. Lanni and A. Konnerth, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marple, S. L. (1999). "Computing the discrete-time "analytic" signal via FFT." <u>IEEE</u> <u>Transactions on Signal Processing</u> **47**(9): 2600-2603.
- McLean, J. W., J. D. Freeman, et al. (1998). "Beam spread function with time dispersion." <u>Applied Optics</u> **37**(21): 4701-4711.
- Mie, G. (1908). "Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen." <u>Annalen der Physik</u> 4(25): 377-445.

Minsky, M. (1961). Microscopy Apparatus. U.S. Patent 3013467. USA.

- Minsky, M. (1988). "Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope." <u>Scanning</u> **10**(4): 128-138.
- Mobley, J. and T. Vo-Dinh (2003). Optical Properties of Tissue. <u>Biomedical Photonics</u> <u>Handbook</u>. T. Vo-Dinh. Boca Raton, CRC Press.
- Müller, G. (1985). Elektrische Maschinen. Berlin, VEB Verlag Technik.
- Neil, M. A. A., A. Squire, et al. (2000). "Wide-field optically sectioning fluorescence microscopy with laser illumination." Journal of Microscopy-Oxford 197(Part 1): 1-4.
- Neil, M. A. A., R. Juskaitis, et al. (1997). "Method of Obtaining Optical Sectioning by Using Structured Light in a Conventional Microscope." <u>Optics Letters</u> 22(24): 1905-1907.
- Nyquist, H. (1928). "Certain Topics in Telegraph Transmission Theory." <u>AIEE Trans.</u> 47: 617-644.
- Oheim, M., E. Beaurepaire, et al. (2001). "Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth." Journal of Neuroscience Methods 111(1): 29-37.
- Oppenheim, A. V. and R. Schafer (1999). <u>Discrete Time Signal Processing</u>. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall.
- Ratzlaff, E. H. and A. Grinvald (1991). "A Tandem-Lens Epifluorescence Macroscope -Hundred-Fold Brightness Advantage for Wide-Field Imaging." <u>Journal of</u> <u>Neuroscience Methods</u> 36(2-3): 127-137.
- Saleh, B. E. A. and M. C. Teich (1991). <u>Fundamentals of Photonics</u> New York, John Wiley & Sons.
- Shannon, C. E. (1949). "Communication in the Presence of Noise." <u>Proceedings of the</u> <u>Institute of Radio Engineers</u> **37**(1): 10-21.
- Shoham, D., D. E. Glaser, et al. (1999). "Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes." <u>Neuron</u> 24(4): 791-802.
- Spors, H. and A. Grinvald (2002). "Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb." <u>Neuron</u> **34**(2): 301-315.

Steel, W. H. (1956). "The defocused image of sinusoidal gratings." Optica Acta 3: 65-74.

- Stockseth, P. A. (1969). "Properties of a Defocused Optical system." J. Opt. Soc. Am. 59(10): 1314-1321.
- Stoppini, L., P. A. Buchs, et al. (1991). "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." Journal of Neuroscience Methods 37(2): 173-82.
- Svoboda, K., D. W. Tank, et al. (2000). Two-photon Imaging of Neuronal Function in the Neocortex In Vivo. <u>Imaging Neurons</u>. R. Yuste, F. Lanni and A. Konnerth. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Theer, P. (2004). On the fundamental imaging-depth limit in two photon microscopy, Univ. Heidelberg (Diss.).
- Theer, P., M. T. Hasan, et al. (2003). "Two-photon imaging to a depth of 1000 mu m in living brains by use of a Ti : Al2O3 regenerative amplifier." <u>Optics Letters</u> 28(12): 1022-1024.
- Titchmarsh, E. C. (1937). <u>The Theory of Fourier Integrals</u>. New York, Oxford University Press.
- Toga, A. W. and J. C. Mazziotta (2002). <u>Brain Mapping, The Methods</u>. San Diego, Academic Press.
- Tominaga, T., Y. Tominaga, et al. (2000). "Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices." Journal of Neuroscience Methods **102**(1): 11-23.
- Tsien, R. Y. (1981). "A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells." <u>Nature</u> **290**(5806): 527-8.
- Ville, J. (1948). "Theorie et application de la notion de signal analytique." <u>Cables</u> <u>Transm.</u> **2**: 61-74.
- Webb, S. E. D., Y. Gu, et al. (2002). "A wide-field time-domain fluorescence lifetime imaging microscope with optical sectioning." <u>Review of Scientific Instruments</u> 73(4): 1898-1907.
- Williams, T. (1999). <u>The Optical Transfer Function of Imaging Systems</u> Bristol, IOP Publishing.
- Wilson, T. and C. Sheppard (1984). <u>Theory and Practice of Scanning Optical</u> <u>Microscopy</u>. London, Academic Press.

- Wilson, T. and D. Karadaglic (2000). <u>Image Formation in conventional fluorescence</u> <u>optical microscopes with structured illumination</u>. Proceedings of the Inter-Institute Workshop on in-vivo optical imaging at the NIH.
- Yae, H., S. A. Elias, et al. (1992). "Deblurring of three-dimensional patterns of evoked rat cerebellar cortical activity: a study using voltage-sensitive dyes and optical sectioning." Journal of Neuroscience Methods **42**(3): 195-209.
- Yaroslavsky, A. N., P. C. Schulze, et al. (2002). "Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range." <u>Physics in Medicine and Biology</u> 47(12): 2059-2073.
- Yu, P., M. Mustata, et al. (2003). "Holographic optical coherence imaging of tumor spheroids." <u>Applied Physics Letters</u> 83(3): 575-577.
- Zochowski, M., M. Wachowiak, et al. (2000). "Concepts in imaging and microscopy -Imaging membrane potential with voltage-sensitive dyes." <u>Biological Bulletin</u> **198**(1): 1-21.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen denen danken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Winfried Denk, der mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit gab und mich durch seine umsichtige Anleitung und seine Unterstützung dabei begleitet hat.

Prof. Dr. Josef Bille für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Marcus Feierabend, Dr. Dorine Keusters, Dr. Bernd Kuhn, Markus Rückel und Dr. Patrick Theer für fruchtbare Diskussionen über die verschiedenen Aspekte dieser Arbeit; Bernd, Markus und Patrick auch für kritisches Lesen der Dissertation, Bernd auch noch für die Hilfe bei den biologischen Experimenten.

Prof. Dr. Fred Hamprecht für hilfreiche Diskussionen zur Datenauswertung

Dr. Maz Hasan für die Präparation bei den *in vivo* Experimenten, **Andy Migala** für die Herstellung der Hirnschnitte.

Michael Müller und Jürgen Tritthardt für vielfältige Hilfestellung bei den technischen Aspekten der Arbeit.

Den Kollegen der Abteilung BMO insgesamt für eine Arbeitsatmosphäre, die man sich kaum besser wünschen kann.

Der Werkstatt des Instituts, insbesondere Manfred Hauswirth und Harald Klemke, für die Herstellung einer ganzen Reihe von mechanischen Komponenten des experimentellen Aufbaus in konstruktiver Zusammenarbeit.

Ramon Granadillo für die Literatur und manche amüsante Stunde

Christa Hörner-Ehm für die unkomplizierte Hilfe bei allen Verwaltungsangelegenheiten und für ein immer offenes Ohr bei sonstigen Schwierigkeiten.

Lala Adueva für die Zeit und die Unterstützung in den ersten drei Jahren.

Meiner Familie, die mich immer darin bestärkt hat, diesen Weg zu gehen.

Susanne Haußelt für manche Hilfe, besonders aber für ihre Geduld und Einsicht in der Schlußphase der Arbeit, und überhaupt dafür daß sie bei mir ist.