

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Gerrit Best

aus Ludwigshafen am Rhein

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2014

**Entwicklung eines hochauflösenden Ophthalmoskops mit
strukturierter Beleuchtung und Beiträge zur Verbesserung der
zugrundeliegenden Mikroskopiemethode**

**Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer
Prof. Dr. Jürgen Hesser**

Entwicklung eines hochauflösenden Ophthalmoskops mit strukturierter Beleuchtung und Beiträge zur Verbesserung der zugrundeliegenden Mikroskopiemethode

Die strukturierte Beleuchtung stellt eine die ganze Bildfläche simultan betrachtende Fluoreszenzmikroskopietechnik dar. Durch computergestützte Nachbearbeitung, die sogenannte Rekonstruktion, der mit einem periodischen Muster beleuchteten Aufnahmen lassen sich supraauflösende Bilder erzeugen.

Die konventionelle Rekonstruktion strukturierter beleuchteter Daten benötigt ein geringes relatives Rauschniveau, also ein starkes Signal, um gute Ergebnisse zu erreichen, was in der Praxis insbesondere bei lebenden Objekten oftmals nicht realisierbar ist. Daher wurde eine entfaltungsbasierte Methode, die auf einer Sortierung der Bildpunkte beruht, zur Rekonstruktion strukturierter beleuchteter Daten entwickelt, welche einen deutlich geringeren Einfluss des Rauschens auf das Ergebnis aufweist. Eine weitere bisherige Einschränkung der strukturierten Beleuchtung liegt in der geringen Größe des aufnehmbaren Bereichs. Um dennoch die supraauflösende Untersuchung großer Volumina zu ermöglichen, wurde ein Verfahren zur Bildzusammenführung erarbeitet, das das Bleichen der Fluoreszenz berücksichtigt. Die altersbedingte Makuladegeneration ist die häufigste Erblindungsursache in der westlichen Welt. Zur Aufzeichnung mit dieser Erkrankung einhergehender, autofluoreszenter Veränderungen im Augenhintergrund mit hoher Auflösung, wurde ein Ophthalmoskop mit strukturierter Beleuchtung entwickelt und seine Leistungsfähigkeit im Rahmen einer klinischen Studie überprüft. Die Gegenüberstellung mit einem leistungsfähigen konventionellen Vergleichsprodukt zeigt eine deutlich verbesserte Auflösung des erhaltenen Bildes. Dadurch kann die entwickelte Technik einen entscheidenden Beitrag zur besseren Untersuchung und Diagnose der Makuladegeneration liefern.

Development of a Structured Illumination Ophthalmoscope for High Resolution Imaging of the Human Eyeground and Improvements to Structured Illumination Microscopy

Structured Illumination Microscopy is a technique based on patterned illumination, which illuminates the whole sample with spatially modulated light, followed by complex data post-processing (reconstruction) in order to extract super-resolution information.

The conventional reconstruction methods are very noise sensitive and therefore require strong signal in the data acquired. However, this is difficult to achieve in many cases such as imaging of living specimen. To overcome this drawback, an iterative deconvolution-based reconstruction method relying on a pixel-sorting scheme was developed. Simulation as well as real-world microscopic data provide proof of the alternative method's superiority. Another limitation of SIM has been posed by the restriction to small observable areas. Therefore an image stitching method was devised to nevertheless be able to analyse large volumes.

Furthermore, a structured illumination ophthalmoscope (SIO) was developed to study age-related macular degeneration (AMD). Accompanied by the accumulation of auto-fluorescent particles in the retina, AMD is the main cause of blindness in the Western world. A clinical trial shows that the new method is able to generate images at higher resolution and quality than previously obtainable. As a result, the developed SIO contributes to improved diagnosis and research on AMD.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Gliederung der Dissertation	4
3	Hilfsmittel	5
4	Grundlagen	6
4.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie	6
4.1.1	Bildgebung durch Linsen	6
4.1.2	Begrenztheit der Auflösung	7
4.1.3	Fluoreszenzmikroskopie	16
4.1.4	Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie	18
4.1.4.1	Konfokalmikroskopie	18
4.1.4.2	STED	20
4.1.4.3	Mehrphotonenmikroskopie	21
4.1.4.4	Lokalisationsmikroskopie	22
4.1.4.5	Strukturierte Beleuchtung	22
4.1.5	Rauschen	23
4.1.5.1	Photonenrauschen	23
4.1.5.2	Kamerarauschen	24
4.1.5.3	Dunkelstromrauschen	25
4.1.5.4	Ausleserauschen	25
4.1.5.5	Gesamtrauschen	25
4.1.6	Abtastrate	26
4.1.7	Entfaltung von Mikroskopiedaten	27
4.1.7.1	Inverses Filtern	27
4.1.7.2	Iteratives Entfalten	28
4.1.8	Verschiebungsbestimmung von Bildern durch Phasenkorrelation . .	30
4.2	Grundlagen der strukturierten Beleuchtung	31
4.2.1	Bildentstehung bei strukturierter Beleuchtung	31

4.2.1.1	Beleuchtungsmuster	31
4.2.1.2	Bildentstehung	33
4.2.1.3	SIM mit mitfahrendem Beleuchtungsmuster	36
4.2.2	Frequenzraumbasierte Bildrekonstruktion	38
4.2.2.1	2D Rekonstruktion	40
4.2.3	Resultierende Auflösungsverbesserung	41
4.2.4	Dreistrahlinterferenz	42
4.2.5	Zweistrahlinterferenz	44
4.2.6	praktische Realisierung	44
4.3	Das verwendete Mikroskop	46
4.4	Medizinische Fragestellung	49
4.4.1	Das retinale Pigmentepithel (RPE)	49
4.4.2	Lipofuszin	50
4.4.3	Die altersbedingte Makuladegeneration	54
4.4.3.1	Trockene AMD	54
4.4.3.2	Feuchte AMD	55
4.4.4	Bildgebungsmethoden zur Darstellung des Augenhintergrundes	56
4.4.5	Das menschliche Auge als optisches System	58
4.4.5.1	Absorption, Streuung und Autofluoreszenz	59
4.4.5.2	Effekte der Lichtleitung durch die Photorezeptoren	60
4.4.5.3	Abbildungsfehler des Auges	62
4.4.5.4	Natürliche Augenbewegungen	65
5	Methoden	67
5.1	Bildzusammenführung	67
5.1.1	Motivation	67
5.1.2	Bleichkorrektur	70
5.1.3	Arbeitsablauf	73
5.2	SIM-Rekonstruktion durch Pixelsortierung und iterative Entfaltung	79
5.2.1	Rückblick: Konventionelle Rekonstruktion	79
5.2.2	Maximum-Likelihood-Entfaltung bei SIM	80

5.2.3	Auffassung von SIM als Konfokalmikroskopie	81
5.2.4	SIM-Rekonstruktion mit Hilfe geeigneter Pixel-Sortierung	82
5.2.5	Pixel-Sortierung mit Phaseninterpolierung	87
5.2.6	Entfaltung der sortierten Daten	91
5.2.6.1	Likelihoodfunktion	91
5.2.6.2	Praktische Realisierung	95
5.2.6.3	Entfaltung zweidimensionaler Daten	96
5.3	Das Ophthalmoskop mit strukturierter Beleuchtung	98
5.3.1	Planung und Entscheidungsfindung	98
5.3.2	Aufbau	100
5.3.2.1	Laser	100
5.3.2.2	Laserblende	102
5.3.2.3	Ansteuerung mittels Mikrocontroller	102
5.3.2.4	Ansteuerungsplatine und Sicherheitsabschaltung	103
5.3.2.5	Gittererzeugung für strukturierte Beleuchtung	104
5.3.2.6	Streulichtbeleuchtung	109
5.3.2.7	Kamera	110
5.3.2.8	Optischer Aufbau	111
5.3.2.9	Software	115
5.3.2.10	Kopfstütze zur Fixierung der Probanden	116
5.3.2.11	Kosten des erstellten Gerätes	117
5.3.3	Voruntersuchungen am Kunstauge	118
5.3.4	Die klinische Studie	119
5.3.5	Bildrekonstruktion	125
5.3.6	Beiträge anderer Personen	126
6	Ergebnisse	127
6.1	Bildzusammenführung	127
6.2	Entfaltungsbasierte Bildrekonstruktion	131
6.2.1	Simulation	131
6.2.2	Kreuzvalidierungsbasierter Iterationsabbruch	134

6.2.3	Echte Daten	136
6.3	Erste Ergebnisse der klinischen Prüfung des Ophthalmoskops	139
6.3.1	Datenaufnahme	139
6.3.2	Bildrekonstruktion	140
7	Diskussion	143
7.1	Bildzusammenführung	143
7.1.1	Anwendung zur Lipofuszinbildung	143
7.1.2	Schwankende Melanin- und Lipofuszinindichte	143
7.2	Entfaltungsbasierte SIM Rekonstruktion mit Pixelsortierung	145
7.2.1	Artefaktanfälligkeit	145
7.2.2	Rechenaufwand	146
7.2.3	Vergleich mit alternativen entfaltungsbasierten Methoden	148
7.3	Ophthalmoskop mit strukturierter Beleuchtung	149
7.3.1	Bewertung der Ergebnisse	149
7.3.2	Medizinische Deutung	149
7.3.3	Verbesserungsmöglichkeiten	150
7.3.3.1	Fixierung	150
7.3.3.2	Adaptive Optik	151
7.4	Fazit	152
8	Danksagung	154
A	Anhang	162
A.1	Abkürzungen und Fremdwörter	162
A.2	Mehrfach genutzte mathematische Symbole	163
A.3	Bildgebung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)	164
A.4	<i>Noise Amplification</i> bei Maximum-Likelihood-Entfaltung	166
A.5	Rahmendaten der klinischen Studie	170
A.6	Teileliste Ophthalmoskop	171

1 Einleitung

Die Physik im Allgemeinen beschreibt die Natur mithilfe mathematischer Modelle und leitet anhand dieser Vorlagen Vorhersagen ab. Die Verlässlichkeit der Ergebnisse hängt daher wesentlich davon ab, wie präzise die Modelle die Wirklichkeit wiedergeben. Auch wenn die Physik in der Lage ist, unsere Welt umfassend zu beschreiben, ist es zur Lösung konkreter Probleme in der Regel erforderlich, eine Reihe von einschränkenden Annahmen vorzusetzen.

Gängige Annahmen in der Fluoreszenzmikroskopie sind:

- Objekt und Bild sind über eine skalare Koordinatentransformation verbunden.
- Jeder Punkt im Objekt ist im Bild durch die gleiche Verschmierungsfunktion (*point spread function*; PSF) verbreitert wiedergegeben und die Intensität des Objekts fließt linear in das Bild ein. Hiermit kann die Verschmierung über eine Faltung ausgedrückt werden. Die Faltung wiederum kann über die Fouriertransformation zur Multiplikation linearisiert werden, was die analytische und numerische Lösung von Bildgebungsproblemen ermöglicht bzw. erleichtert.
- Das Objekt steht während der Aufnahme still oder bewegt sich lediglich auf bekannte Weise.

Die mathematische Herleitung der Bildgebung beruht in der Regel auf der Berechnung der Intensitätsverteilung im Bild. Das tatsächlich gemessene Bild gibt allerdings nur einen Messwert der (über den Messzeitraum integrierten) Intensität wieder und ist durch die Poissonverteilung der Photonen und andere Rauschquellen beeinflusst.

Das Rauschen des Signals lässt sich zwar recht präzise modellieren, allerdings setzen alle Methoden die im Ortsfrequenzraum arbeiten, fälschlicherweise ein signal- und ortsunabhängiges Rauschen voraus, um in der Lage zu sein, eine hochauflösende Schätzung des unbekanntes Objekts aus dem aufgenommenen Bild zu erzeugen. So arbeitet beispielsweise die konventionelle Theorie der Bildentstehung bei strukturierter Beleuchtung und die davon abgeleitete Objektrekonstruktion (Abschnitt 4.2) im Frequenzraum.

Um ein gutes Ergebnis trotz der Kenntnis der Unzulänglichkeiten des Modells zu erreichen, muss entweder dieses angepasst werden, oder das Experiment muss so gestaltet werden, dass es die Annahmen hinreichend erfüllt. Um beispielsweise den Rauscheinfluss zu reduzieren, kann man das Bildsignal erhöhen. Um den Einfluss von Objektbewegungen zu reduzieren, kann die Aufnahmedauer verkürzt werden. Wie an diesen beiden Beispielen deutlich wird, sind die Ansätze oft entgegengerichtet, da hier eine verkürzte Aufnahmedauer ohne gleichzeitige Erhöhung der Lichtintensität eine Verringerung des aufgezeichneten Signals bewirkt.

Die relativ neuen superauflösenden Fluoreszenzmikroskopiemethoden, welche in der Lage sind, Objektinformation jenseits der Beugungsgrenze zu extrahieren, erkaufen sich diese Fähigkeit durch zusätzliche Einschränkungen hinsichtlich ihres Anwendungsspektrums. So benötigen die meisten hochauflösenden Techniken spezielle Fluorophore, welche die den Methoden zugrunde liegenden physikalischen bzw. chemischen Prozesse besonders ausgeprägt aufweisen.

Die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (*structured illumination microscopy*, SIM) nimmt hierbei eine Ausnahmestellung ein, da sie keine speziellen Anforderungen an die aufzuzeichnenden Fluorophore stellt und dennoch eine Auflösungsverbesserung von bis zu einem Faktor zwei bieten kann. Aus diesem Grund stellt sie eine der verbreitetsten superauflösenden Methoden dar. Mittlerweile werden von allen namhaften Herstellern entsprechende Geräte vertrieben.

Die Tatsache, dass SIM beliebige Fluorophore nutzen kann, macht diese Technik insbesondere geeignet zur Bildgebung von autofluoreszierenden Präparaten, also Proben, welche ohne vorherige Markierung Fluoreszenz aufweisen.

Im Rahmen der beschriebenen Doktorarbeit wurde SIM verwendet, um autofluoreszierende Ablagerungen zu untersuchen, welche sich in den Zellen des Augenhintergrundes im Zusammenhang mit der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) ansammeln.

AMD stellt die häufigste Erblindungsursache in der westlichen Welt dar. Dennoch sind die Mechanismen, die zu dieser Erkrankung führen, verhältnismäßig schlecht erforscht. Im Vorfeld insbesondere der sogenannten trockenen Verlaufsform der Erkrankung kommt es zur verstärkten Ablagerung autofluoreszierender Partikel (Lipofuszingranula) im retinalen Pigmentepithel (RPE). Die gegenwärtige Kenntnis über Zusammensetzung und Verteilung dieser Granula, sowie ihren Einfluss auf die Entwicklung der AMD ist unbefriedigend. Für die trockene Verlaufsform steht überdies keine Therapiemöglichkeit zur Verfügung. Ein umfassenderes Grundlagenwissen der zugrunde liegenden Mechanismen wäre zur Entwicklung eines fundierten Behandlungsansatzes erforderlich.

Das Hauptprojekt meiner Doktorarbeit war die Entwicklung eines Ophthalmoskops zur hochauflösenden Bildgebung autofluoreszenter Strukturen im menschlichen Augenhintergrund um die Lipofuszinverteilung *in vivo* präziser darstellen zu können. Das Ziel der hochauflösenden Sichtbarmachung der Lipofuszinverteilung liegt darin, charakteristische, auf eine Entwicklung der AMD hinweisende, Muster zu erkennen und damit eine bessere Diagnosemöglichkeit und Erforschbarkeit dieser Erkrankung bereitzustellen.

Hierzu wurde die superauflösende Mikroskopietechnik der strukturierten Beleuchtung erstmals zur Darstellung von Fluoreszenz im Augenhintergrund angewandt. Das menschliche Auge als optisches System weist im Vergleich zu künstlicher Optik mehrere Besonderheiten auf und es mussten Methoden entwickelt werden, den hieraus resultierenden Schwie-

rigkeiten im Rahmen der Bildgebung entgegenzutreten. So ruht beispielsweise das Auge keineswegs während der Bildaufnahme, sondern vollzieht unvorhersehbare Bewegungen, was bei der Entwicklung des Gerätes berücksichtigt werden musste. Ein Hauptaugenmerk bei der Planung des Ophthalmoskops stellte auch die Gewährleistung der Sicherheit des Untersuchten dar. Daher musste die Beleuchtungsintensität, welche zur Fluoreszenzanregung genutzt wird, und die gesamt eingestrahlte Lichtmenge in jedem Fall unter einem potentiell schädlichen Niveau liegen. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde das erstellte Instrument in der Augenklinik Heidelberg erfolgreich getestet.

Über diesen Aspekt der *in-vivo*-Diagnostik am lebenden Probanden bzw. Patienten hinaus wurden Untersuchungen an Gewebepreparaten mit einem in der Arbeitsgruppe erstellten SIM durchgeführt. Obwohl die Anwendung von SIM gegenüber anderen supraauflösenden Methoden nur geringfügig limitiert ist, gibt es im Vergleich zu konventionellen Mikroskopietechniken gewisse Einschränkungen.

Da es sich um eine Weitfeldmethode handelt, welche die gesamte Bildfläche simultan aufzeichnet, ist die zu untersuchende Region durch die Größe des Bilddetektors beschränkt. Zur Ermöglichung von Untersuchungen großer Regionen wurde daher ein Bildzusammenführungsverfahren (engl. *image stitching*) entwickelt, welches das Bleichen der Fluoreszenz korrigiert und dabei die Besonderheiten der strukturierten Beleuchtung berücksichtigt.

Eine weitere wesentliche Einschränkung der Anwendbarkeit der strukturierten Beleuchtung im Allgemeinen, und im Fall der Untersuchung der ophthalmologischen Präparate mit dieser Technik im Speziellen ist die starke Abhängigkeit des Verfahrens vom Bildrauschen. Um ein supraauflösendes Bild zu generieren, müssen für die konventionelle Bildrekonstruktionsmethode relativ gute, rauscharme Bilder vorliegen. Damit auch bei schwachem Signal klare Bilder rekonstruiert werden können, wurde ein alternatives Rekonstruktionsverfahren erarbeitet, welches im Gegensatz zur konventionellen, frequenzraum-basierten Methode, die Bildpunkte im Ortsraum sortiert. Im Anschluss an die Sortierung wird ein *maximum-likelihood*-basiertes Entfaltungsverfahren angewandt um supraauflösende Bilder zu erzeugen, die im Gegensatz zu konventionell rekonstruierten wesentlich schwächer mit Rauschartefakten behaftet sind.

Die Anwendung der alternativen Rekonstruktionsmethode ist nicht auf die Untersuchung retinaler Präparate beschränkt, sondern lässt sich generell verwenden, um bei SIM rauschärmere Ergebnisse zu erhalten. Insbesondere bei Aufnahmen, welche inhärent eine geringe Signalstärke aufweisen, bewirkt die iterative entfaltungsbasierte Rekonstruktion einen großen Qualitätsgewinn.

2 Gliederung der Dissertation

In diesem Dokument werden zunächst die Grundlagen erläutert und anschließend die eigenen Arbeiten beschrieben und diskutiert. Eine alternative Gliederung wäre die Einteilung in einzelne Themen gewesen, um die separierten Teilbereiche möglichst geschlossen abzudecken. Eine solche Einteilung wäre zwar dem Lesefluss dienlich, hätte aber den entscheidenden Nachteil, dass der Leser nur schwer in der Lage wäre, die im Rahmen der Arbeit vollzogene Recherche von den eigenen Beiträgen zu trennen.

Aus diesem Grund weist das Dokument, soweit praktikabel, eine Trennung in Grundlagen, Methoden und Ergebnisse auf. Möchte der Leser ein Thema nach dem anderen bearbeiten, kann hierzu jeweils direkt von den Grundlagen eines Themas zum entsprechenden Methodenteil und so fort gesprungen werden.

Im Folgenden ist die Gliederung der Arbeit im Detail beschrieben.

Zunächst werden die **Grundlagen** der mikroskopischen Bildgebung für die Betrachtung von Fluoreszenz (inkohärent strahlende Punktlichtquellen) hergeleitet. Im Anschluss werden Fluoreszenzmikroskopie und aktuelle hochauflösende fluoreszenzmikroskopische Methoden, also der Stand der Technik, beschrieben. Der verwendete Mikroskopaufbau wird geschildert und für die Arbeit relevante Begebenheiten, insbesondere die konventionelle Bildrekonstruktion bei strukturierter Beleuchtung, werden aufgezeigt. Es folgt die Zusammenfassung der medizinischen Fragestellung und die Beschreibung der Schwierigkeiten der Bildgebung am menschlichen Auge.

Im **Methodenteil** werden zunächst die Methoden der Bildzusammenführung (*image stitching*) und der Rekonstruktion von SIM-Daten durch Pixelsortierung und Entfaltung dargestellt und es folgt eine Beschreibung des erstellten Ophthalmoskops zur hochauflösenden Untersuchung des Augenhintergrundes am Menschen.

Im Anschluss werden die **Ergebnisse** der Arbeit Themenweise aufgezeigt und im Folgenden **diskutiert**.

Abschließend wird zusammenfassend ein **Fazit** über die erarbeiteten Methoden und Ergebnisse gezogen.

3 Hilfsmittel

Die Ansteuersoftware des hochauflösenden Mikroskops basiert auf der Programmiersprache **Python**¹. Zur Bildverarbeitung, zur Datenauswertung und zum Erstellen von Programmen und Skripten hierzu wurde hingegen zum überwiegenden Teil die kommerzielle Programmierumgebung **Matlab** (MathWorks, Natick, MA, USA) verwendet. Matlab hat gegenüber anderen („richtigen“) Programmiersprachen einige Nachteile. Beispielsweise sind Operationen auf einzelnen Elementen in Arrays sehr langsam und unter bestimmten Bedingungen kommt es zu Fehlern, welche durch die proprietäre Natur der Software nicht nachvollziehbar sind (z.B. im Rahmen der Speicherverwaltung). Andererseits bietet Matlab den Vorteil, dass es weit verbreitet ist und damit für viele Fragestellungen bereits Lösungen existieren. Zudem ist Matlab auch durch die von MathWorks angebotenen Toolboxen sehr mächtig. Für die Bildverarbeitung wurde in großem Umfang die *open source* **DIPimage** Toolbox² (Quantitative Imaging, Delft University of Technology, Niederlande) verwendet. Zur Nutzung von CUDA (NVIDIA, Santa Clara, CA, USA) im Rahmen der Matlab Programme, wurde **CudaMat**³ von Rainer Heintzmann (IPHT Jena, Universität Jena) verwendet. Dieses Paket orientiert sich syntaktisch an DIPimage. Zur frequenzraumbasierten (konventionellen) Rekonstruktion strukturiert beleuchteter Daten wurde auf Matlab basierende Software verwendet (**PEM-Software**), welche von Rainer Heintzmann zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Überprüfung analytischer Lösungswege wurde **Mathematica** (Wolfram Research, Champaign, IL, USA) genutzt.

Die Schaubilder in dieser Arbeit wurden mit **Corel Draw** (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) erstellt.

Optische Strahlengänge wurden mit **WinLens Basic** von QiOptiq (Göttingen) berechnet, während zur Planung der elektronischen Schaltungen **Target 3001!** (Ing.-Büro Friedrich, Eichenzell) genutzt wurde.

Die dreidimensionalen Darstellungen von mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Programm **Vaa3D**⁴ (Hanchuan Peng Lab, Allen Institute for Brain Science, Seattle, WA, USA) erzeugt.

Die Erstellung dieses Dokumentes erfolgte mit \LaTeX .

¹<https://www.python.org/>

²<http://www.diplib.org/dipimage>

³<http://www.nanoimaging.uni-jena.de/CudaMat/CudaMat.html>

⁴<http://www.vaa3d.org/>

4 Grundlagen

4.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

4.1.1 Bildgebung durch Linsen

Die Mikroskopie von altgriechisch $\mu\kappa\rho\acute{o}\varsigma$ (mikros: klein) und $\sigma\kappa\omicron\pi\epsilon\acute{\iota}\nu$ (skopein: Betrachten/Untersuchen) bezeichnet die bildgebende Untersuchung kleiner, mit dem bloßen Auge nicht wahrnehmbarer Objekte.

In der Lichtmikroskopie wird die hierzu erforderliche Vergrößerung des Bildes durch Linsensysteme erreicht. Ein einfaches vergrößerndes System, bestehend aus einer konvexen Linse, ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

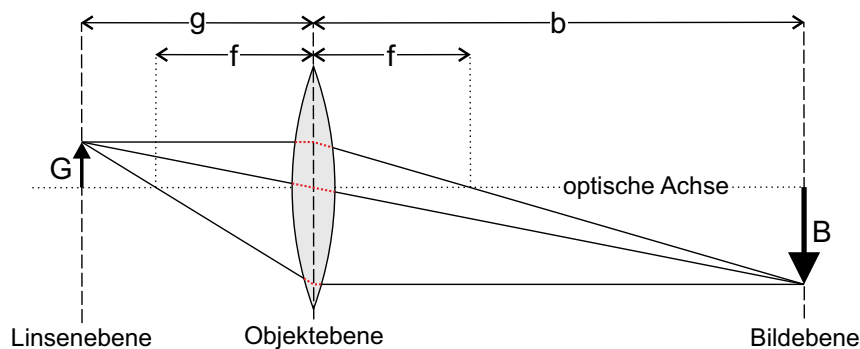


Abbildung 4.1: Elementares linsenbasiertes Abbildungssystem zur vergrößernden Bildgebung. Der Lichtstrahlverlauf innerhalb der Linse (rot gestrichelt) basiert auf der paraxialen Näherung für dünne Linsen. Die erreichte Vergrößerung lässt sich aus der Linsengleichung (4.1) berechnen.

Jeder Punkt aus der Objektebene wird durch die Linse auf einen Punkt in der Bildebene fokussiert, wodurch in dieser Ebene ein Bild des Gegenstandes erzeugt wird. Für ein solches System aus einer Linse lässt sich geometrisch die Linsengleichung (4.1) herleiten:

$$\frac{1}{b} + \frac{1}{g} = \frac{1}{f} \quad (4.1)$$

mit der Bildweite b , der Gegenstandsweite g und der Brennweite der Linse f . Für das Verhältnis von Bildgröße B zu Gegenstandsgröße G , also die Vergrößerung m , gilt

$$m = \frac{B}{G} = \frac{b}{g}. \quad (4.2)$$

Für komplexere Linsensysteme aus mehreren Linsen lässt sich die Linsengleichung mehrfach hintereinander anwenden, um die Vergrößerung zu berechnen. Bei der Linsengleichung handelt es sich allerdings um eine Näherung für dünne Linsen (paraxiale Näherung). In der Praxis sind insbesondere in hochauflösenden, stark vergrößernden Objektiven die

Gegebenheiten weit von den Anforderungen an eine gute Näherung entfernt. Dennoch lässt sich auch hier die Vergrößerung m geometrisch durch das Verfolgen einzelner Lichtstrahlen durch die verschiedenen brechenden Ebenen zu ihrem Fokuspunkt (numerisch) berechnen. Das Verfahren der Strahlverfolgung wird *ray tracing* genannt.

Da die Vergrößerung für alle Punkte $\mathbf{r}_g = (x_g, y_g, z_g)$ in der Nähe der Objektebene (näherungsweise) identisch ist, gilt für die Orte in Objektraum und Bildraum der Zusammenhang

$$\mathbf{r}_b = \mathbf{M} \cdot \mathbf{r}_g \text{ mit } \mathbf{M} = \begin{pmatrix} m_x & 0 & 0 \\ 0 & m_y & 0 \\ 0 & 0 & m_z \end{pmatrix}. \quad (4.3)$$

Gegenstand und Bild sind also über eine orthogonale, skalare Koordinatentransformation verknüpft. Bei der Verwendung sphärischer Linsen gilt $m_x = m_y = m$. Ist die Bildweite deutlich größer als die Gegenstandsweite, die laterale Vergrößerung m also hoch, ergibt sich in der paraxialen Näherung für die Vergrößerung entlang der optischen Achse $m_z = m^2$.

Aufgrund des linearen Zusammenhangs von Koordinaten in Bild und Objektraum verhalten sich Objekt und Bild analog. Zur Vereinfachung kann man die Vergrößerung gleich eins setzen, was in diesem Dokument konsistent angewandt wird. Hierbei werden immer die auf den Objektraum bezogenen Koordinaten verwendet. Der Pixelabstand der Kamera besitzt dadurch beispielsweise einen Wert im Nanometerbereich, obwohl der tatsächliche Abstand im Mikrometerbereich liegt.

4.1.2 Begrenztheit der Auflösung

In der geometrischen Optik werden alle Details des Objekts ins Bild übertragen, die Auflösung wäre hier also unbegrenzt. Aufgrund der Wellennatur des Lichts lassen sich feine Details allerdings nur bis zu einer Grenze, der sogenannten Beugungsgrenze auflösen. Man kann diesen Effekt daraus herleiten, dass die durch die Linse transmittierten Lichtwellen durch die Grenzen der Linse eine kreisförmige Apertur erfahren. Das auf das Bild fokussierte Licht jedes Punktes des Objekts gibt somit das Beugungsbild der Linse, die sogenannte Punktbildfunktion (englischer Begriff *point spread function*, PSF) wieder.

Zur analytischen Berechnung der PSF geht man von einer einzelnen punktförmigen Lichtquelle im Objektraum aus. Man nimmt an, dass sich das von der Lichtquelle emittierte Licht kugelförmig ausbreitet und auf die Linse trifft. Durch diese wird das Wellenfeld gebrochen, erhält also einen ortsabhängigen Phasenversatz. Zudem wird nur das Licht auf der kreisförmigen Linsenfläche transmittiert.

Ausgehend von der Wellenfunktion hinter der Linse lässt sich die Propagation des Lichts in die Bildebene berechnen, was durch Anwendung des paraxialen Beugungsintegrals möglich ist. Dieses beruht auf der Annahme, dass der Abstand zwischen Linse und Bild bzw. Linse und Objekt groß ist. Die Herleitung der PSF aus dem paraxialen Beugungsintegral ist recht aufwändig, weswegen sie hier nicht ausgeführt wird und stattdessen nur die Ergebnisse gezeigt werden. Für das elektrische Feld ist diese Herleitung im Lehrbuch *Advanced Optical Imaging Theory* von Min Gu[1] beschrieben. In meiner Diplomarbeit[2] ist sie in deutscher Sprache mit Fokussierung auf die PSF und die optische Transferfunktion für die Intensität des Bildes zu finden.

Die PSF lässt sich bis zu folgendem Ausdruck berechnen:

$$h(R, Z) = \frac{M^2}{\lambda^4 g^2} \left| \int_0^1 \exp \left[\frac{iZ\rho^2}{2} \right] J_0(R\rho) \rho d\rho \right|^2 \quad (4.4)$$

Hierbei werden die generalisierten Koordinaten

$$R = \frac{2\pi a \sqrt{x^2 + y^2}}{\lambda b} . \quad (4.5)$$

$$Z = \frac{2\pi a^2}{\lambda} \left(\frac{1}{f} - \frac{1}{b} - \frac{1}{g} \right) . \quad (4.6)$$

verwendet. a bezeichnet den Durchmesser der Linse, während λ die Wellenlänge des Lichts im Medium kennzeichnet. Die Integrationsvariable ρ ist die normierte radiale Koordinate in der Linsenebene

$$\rho = \frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{a} \quad (4.7)$$

mit dem Durchmesser der Linse a .

Während eine geschlossene Lösung des Ausdrucks für die PSF nicht existiert, kann jedoch die Fouriertransformierte der PSF, die optische Transferfunktion (OTF) berechnet werden. Man erhält den folgenden Ausdruck (aus [1])

$$o = \frac{2}{l} \operatorname{Re} \left[\sqrt{1 - \left(\frac{|s|}{l} + \frac{l}{2} \right)^2} \right] \quad (4.8)$$

$$l = \frac{k_r \lambda}{2\pi \sin \alpha} , \quad s = \frac{k_z \lambda}{8\pi \sin^2 \alpha / 2}$$

mit der normierten lateralen Raumfrequenz l und der normierten axialen Raumfrequenz s . Der Winkel α bezeichnet den objektseitigen halben Öffnungswinkel der Linse.

Hieran erkennt man, dass die OTF null ist, sobald

$$|s| \geq l \left(l - \frac{l}{2} \right) \quad (4.9)$$

da dann der Wert unter der Wurzel negativ wird. Eine dreidimensionale Darstellung der Frequenzvektoren, bei denen der Ausdruck unter der Wurzel gleich 0 ist, ist in Abbildung 4.2 zu sehen. Diese Frequenzvektoren stellen die Grenze der OTF dar und können somit als Grenzfrequenz bezeichnet werden.

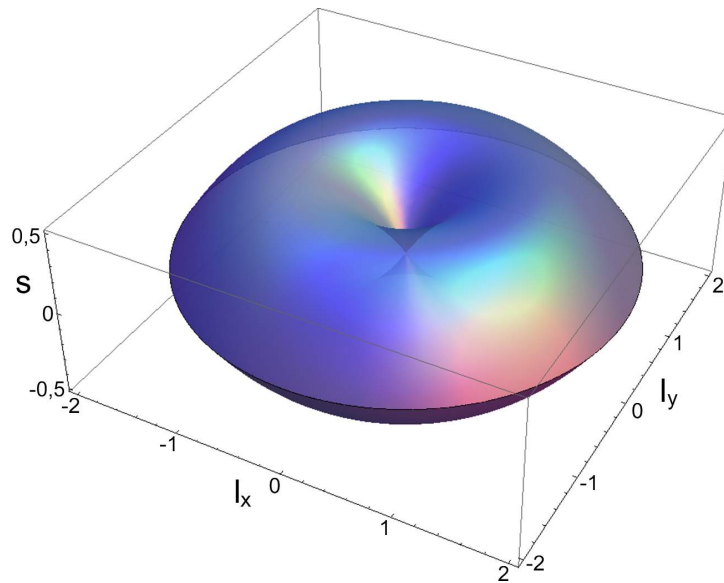


Abbildung 4.2: Die Grenzfrequenzen der OTF in kartesischen normierten Koordinaten (siehe 4.8).

Eine wesentlich elegantere und vor allem anschaulichere Herleitung der PSF und der OTF lässt sich durch die direkte Betrachtung der dreidimensionalen Verteilung des elektrischen Feldes und der Verwendung der dreidimensionalen Fouriertransformation erreichen. Diese Herangehensweise basiert im Gegensatz zur Verwendung des paraxialen Beugungsintegrals auf der Annahme einer hohen Fresnel-Zahl F .

$$F = \frac{a^2}{g \cdot \lambda} \quad (4.10)$$

Es wird hier also angenommen, dass die die Linse groß ist im Vergleich zu Wellenlänge und Gegenstandsweite. Eine vollständige Herleitung dieser Methode ist in einer Arbeit von Arnison und Sheppard [3] zu finden, welche Rückgriff auf eine Theorie von Richards und Wolf [4] nimmt. Zur Vereinfachung wird hier erst an einem späteren Punkt (in der Fokusebene) eingestiegen und der dortige Sachverhalt wird geometrisch aufgezeigt. Der vollständige Weg, der in den zitierten Dokumenten beschrieben ist, leitet sich hingegen von den fundamentalen Gleichungen der Elektrodynamik ab und ist damit rein wellenbasiert.

Außerdem wird in der hier dargelegten vereinfachten Herleitung die Vektorwertigkeit des elektrischen Feldes (die Polarisation des Lichts) vernachlässigt.

Nimmt man an, dass monochromatisches, kohärentes Licht durch eine sphärische Linse auf einen Fokus gebrochen wird, so liegen innerhalb der Fokusregion alle Wellenvektoren auf der Oberfläche einer Kugel (siehe Abbildung 4.3), da das Licht monochromatisch ist ($|\mathbf{k}| = k = \frac{2\pi}{\lambda}$).

Wendet man eine Fouriertransformation des elektrischen Feldes vom Orts- auf den Wellenvektor an, erhält man daher eine Verteilung des fouriertransformierten elektrischen Feldes, die ausschließlich auf dieser Kugeloberfläche liegt.

$$\tilde{E}(\mathbf{k}) = P(\mathbf{k}) \delta(|\mathbf{k}| - k^2) \quad (4.11)$$

Die Funktion P kann komplexwertig sein. Zeitabhängigkeiten sind vernachlässigt, da sie sich beim Bilden der Intensität eliminieren.

Da die Wellenvektoren immer in Ausbreitungsrichtung des Lichts zeigen, hat jeder Wellenvektor seinen Ursprung auf der Linse. Weil die Fläche der Linse kreisförmig begrenzt ist, können die Wellenvektoren nur einen begrenzten Raumwinkel einnehmen. Aufgrund der runden Geometrie der Linsenfläche, ist lediglich eine Kugelkappe besetzt im fouriertransformierten elektrischen Feld $\tilde{E}(\mathbf{k})$.

Jedem Wellenvektor \mathbf{k}_i auf der Kugelkappe ist genau ein Ort \mathbf{r}'_i auf der Linsenfläche zuzuordnen, womit Orte auf der Linsenfläche und Wellenvektoren über eine Koordinatentransformation verbunden werden können. Um diesen Zusammenhang zu generalisieren, bietet es sich an, sowohl den Wellenvektor, als auch den Ort auf der Linsenoberfläche in Kugelkoordinaten darzustellen.

$$\mathbf{r}' = r \begin{pmatrix} \sin \theta \cos \rho \\ \sin \theta \sin \rho \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (4.12)$$

$$\mathbf{k} = k \begin{pmatrix} \sin \theta \cos \rho \\ \sin \theta \sin \rho \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (4.13)$$

Der Ursprung des Kugelkoordinatensystems liegt hierbei für das Feld auf der Linsenfläche im Fokus der Linse und für das fouriertransformierte Feld im Fokus bei der Nullfrequenz ($\mathbf{k}_0 = (0, 0, 0)$).

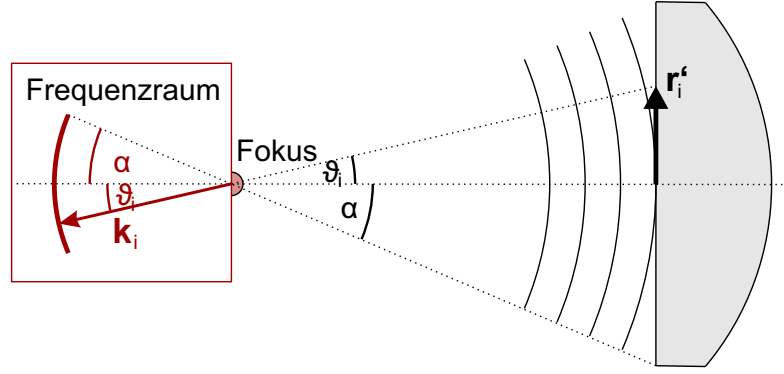


Abbildung 4.3: Da das Licht durch die Linse in den Fokus gebrochen wird, liegen dort die Wellenvektoren vor, welche direkt hinter der Linse vorhanden waren. Jedem Wellenvektor \mathbf{k}_i im Fokus lässt sich genau ein Ort \mathbf{r}_i auf der Linse zuordnen. Der halbe Öffnungswinkel der die Wellenvektoren beinhaltenden Kugelkappe ist mit dem halben Öffnungswinkel der Linse α identisch.

Wie in Abbildung 4.3 gezeigt, sind in dieser Darstellung die Winkelkoordinaten identisch. Man erhält hier also analog zur Fraunhofernäherung den Zusammenhang, dass das Beugungsbild des Feldes an der Linse auf die Fokusebene gleich seiner Fouriertransformierten ist. Die Funktion $P(\mathbf{k})$ gibt aus diesem Grund das Feld auf der Linsenoberfläche wieder. Hat die Linse eine ortsabhängige Transmittivität, lässt sich dies durch Anpassung dieser Funktion berücksichtigen. Besitzt die Linse Aberrationen, ruft sie zusätzlich zur sphärischen Brechung einen orts- bzw. winkelabhängigen Phasenversatz $\phi(\mathbf{k})$ der Lichtwelle hervor. Auf die Welle in komplexer Darstellung wirkt daher durch die Phase der multiplikative Term $e^{i\phi(\mathbf{k})}$. Auf diese Weise lassen sich also beliebige Phasenfunktionen $\phi(\mathbf{k})$ in das Modell einbeziehen.

Nun muss vom fouriertransformierten Feld im Fokus auf das reale Feld und seine Intensität geschlossen werden.

Für das elektrische Feld in der Fokusebene und die Intensität, welche die PSF darstellt, gilt:

$$E(\mathbf{r}) = \mathcal{F}^{-1}(\tilde{E}(\mathbf{k})) = \mathcal{F}^{-1}(P(\mathbf{k})\delta(|\mathbf{k}| - k^2)) \quad (4.14)$$

$$h(\mathbf{r}) = I(\mathbf{r}) = E(\mathbf{r}) \cdot E(\mathbf{r})^* \quad (4.15)$$

In der Regel lässt sich auch hier der Ausdruck für die PSF h nicht analytisch lösen. Für die OTF o , die Fouriertransformierte der PSF gilt:

$$\begin{aligned}
 o(\mathbf{k}) &= \mathcal{F}(I(\mathbf{r})) = \mathcal{F}(E(\mathbf{r})) * \mathcal{F}(E(\mathbf{r})^*) \\
 &= \tilde{E}(k) * \tilde{E}^*(-k) \\
 &= [P(\mathbf{k})\delta(|\mathbf{k}| - k^2)] * [P(\mathbf{k})\delta(|\mathbf{k}| - k^2)]^*
 \end{aligned} \tag{4.16}$$

Das Zeichen $*$ stellt den Faltungsoperator dar. Die OTF bildet sich also aus der Autokorrelation der auf einem Kugelflächenabschnitt liegenden Fouriertransformierten des elektrischen Feldes, welche wiederum identisch ist mit der auf die Kugelfläche gelegten Pupillenfunktion der Linse. Das fouriertransformierte elektrische Feld liegt lediglich auf einer Kugelkappe und ist somit begrenzt, was auch für seine komplex konjugierte gilt. Das fouriertransformierte elektrische Feld als die Faltung dieser beiden Funktionen ist somit ebenfalls begrenzt. Abbildung 4.4 zeigt den geometrischen Zusammenhang zwischen der Kugelkappe und den Grenzfrequenzen der OTF.

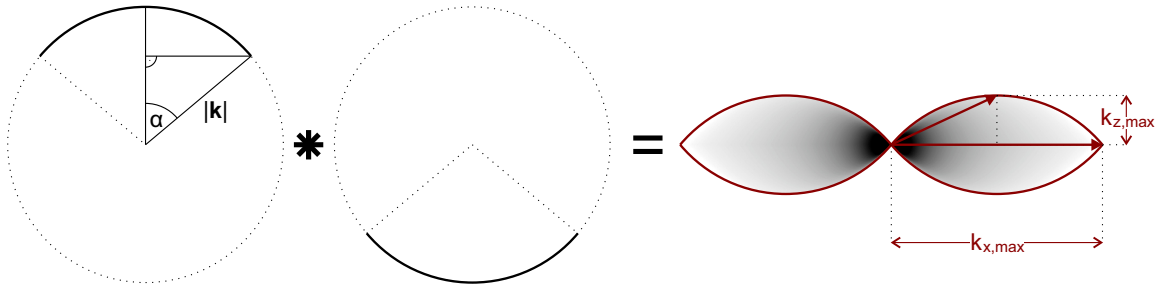


Abbildung 4.4: Konstruktion der optischen Transferfunktion (OTF). Die OTF ergibt sich aus der Auto-korrelation des fouriertransformierten Feldes im Fokus, welches auf einer Kugelkappe liegt. Hieraus lassen sich geometrisch die Grenzen der auflösbaren Frequenzen ($k_{x,\max}$, $k_{z,\max}$) bestimmen.

Die dreidimensionale Ansicht der Grenzfrequenzen ist identisch mit der in Abbildung 4.2 zu sehenden aus der paraxialen Herleitung folgenden Verteilung. Die Grundfläche dieses Toroiden setzt sich aus einem Kreisabschnitt mit einem Öffnungswinkel von 2α zusammen. Hieraus lassen sich, wie in Abbildung 4.4 dargestellt, unmittelbar die Grenzfrequenzen der OTF geometrisch ablesen. In lateraler (x -, bzw. y -) Richtung beträgt die maximal mögliche Komponente des Wellenvektors der OTF

$$k_{xy,\max} = 2k \sin \alpha = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \alpha \tag{4.17}$$

und in axialer Richtung entlang der optischen Achse z

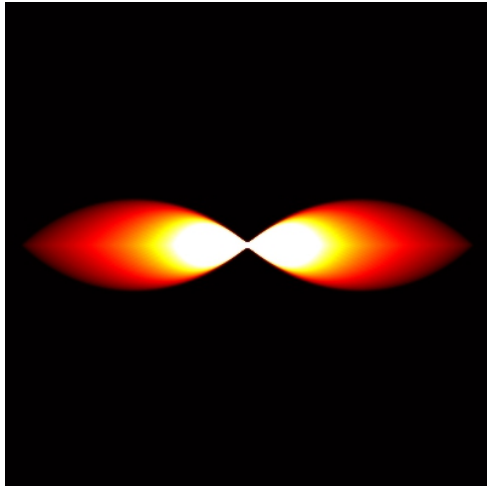
$$k_{z,\max} = k(1 - \cos \alpha) = \frac{2\pi}{\lambda}(1 - \cos \alpha) \tag{4.18}$$

λ ist die Wellenlänge des Lichts im Medium. Offensichtlich stimmen die Grenzfrequenzen mit denen der paraxialen Näherung (Gleichung 4.8 bei $(l = 2, s = 0)$ und $(l = 1, s = 0, 5)$)

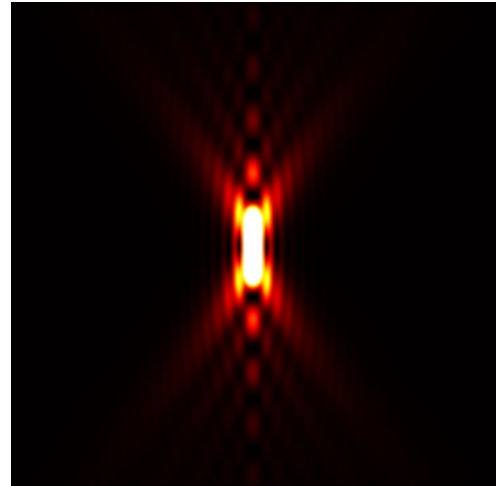
überein.

Mit der dargestellten Methode lassen sich PSF und OTF eines Linsensystems numerisch berechnen. In abgeänderter Form lässt sich zudem die Vektorwertigkeit des elektrischen Feldes in die Simulation einbeziehen um somit die Auswirkung der Polarisation zu berechnen.

Abbildung 4.5 zeigt die simulierten Funktionen in der x - z - bzw. k_x - k_z -Ebene.



(a) Simulierte OTF in der Ebene bei $k_z = 0$.
 k_x : horizontal; k_z : vertikal



(b) Simulierte PSF in der Ebene bei $z = 0$.
 x : horizontal; z : vertikal

Abbildung 4.5: Simulierte optische Transferfunktion (OTF) und ihre entsprechende Punktbildfunktion (PSF). Es wurde die Falschfarbendarstellung „hot“ gewählt

Das Abbild eines Punktes aus dem Objektbereich in den Bildbereich ist also die PSF. Der Ort der PSF liegt dabei auf dem konjugierten Ort des Objektes in der Bildebene. Der Terminus „konjugiert“ (z.B. im Sinne von *conjugate focal plane*) ist in der Optik gebräuchlich, um aufeinander abbildende Ebenen zu bezeichnen. Dies bedeutet nicht zwangsläufig, dass sich Orte auf den Ebenen gespiegelt verhalten.

Befinden sich nun mehrere Punkte in der Objektebene, strahlen diese im Fall der Fluoreszenzmikroskopie untereinander inkohärentes Licht aus. Da hiermit die einzelnen Wellen der Punkte nicht interferieren, ist die Intensitätsverteilung im Bild die Summe der Bilder der einzelnen Punkte.

$$\begin{aligned}
 I(\mathbf{r}) &= \sum_i a_i h(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \\
 &= \sum_i a_i \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) * h(\mathbf{r})
 \end{aligned}
 \tag{4.19}$$

Hier wurde eine Gewichtung a_i verwendet, um zuzulassen dass sich die Helligkeit der ein-

zelenen Punkte unterscheidet. Es ist anzumerken, dass diese Annahme nur für inhärent inkohärente Lichtquellen trägt. Betrachtet man beispielsweise nah beieinander liegende Objekte mit einem Durchlichtmikroskop, muss die Phasenbeziehung des Lichts berücksichtigt werden. In diesem Fall ist die PSF für das elektrische Feld, die Amplituden-PSF, statt derjenigen für die Intensität zu verwenden. Hierbei wird das Betragsquadrat der erhaltenen Feldverteilung erst in der Bildebene berechnet.

Die Summe über alle Fluorophore lässt sich in das Faltungsintegral ziehen, sodass statt einer Summe von Integralen das Integral einer Summe gebildet wird.

$$\begin{aligned} I(\mathbf{r}) &= \sum_i a_i \int \delta(\mathbf{s} - \mathbf{r}_i) \cdot h(\mathbf{r} - \mathbf{s}) \, d\mathbf{s} \\ &= \int \sum_i a_i \delta(\mathbf{s} - \mathbf{r}_i) \cdot h(\mathbf{r} - \mathbf{s}) \, d\mathbf{s} \end{aligned} \quad (4.20)$$

Der vom Summenindex abhängige Anteil lässt sich zu

$$\rho(\mathbf{s}) = \sum_i a_i \delta(\mathbf{s} - \mathbf{r}_i) \quad (4.21)$$

zusammenfassen. Die Objektverteilung ρ bestehend aus der Summe aller Punktlichtquellen ist diskret. In der Regel ist allerdings die Dichte der Fluorophore sehr hoch, sodass häufig angenommen wird, dass der kleinste Abstand zwischen zwei Fluorophoren deutlich kleiner als die Ausdehnung der PSF (im Sinn von Standardabweichung oder Halbwertsbreite) ist. In diesem Fall kann man von einer kontinuierlichen, glatten Fluorophorverteilung ausgehen, was zum Beispiel bei der Entfaltung unter Zuhilfenahme einer glättenden Regularisierung getan wird. ρ ist proportional zur Wahrscheinlichkeitsdichte für die Emission von Photonen und wird im Folgenden Objektverteilung oder einfach Objekt genannt. Die Intensität im Bild ist hiermit also die Faltung des Objekts mit der PSF.

$$\begin{aligned} I(\mathbf{r}) &= \int \rho(\mathbf{s}) \cdot h(\mathbf{r} - \mathbf{s}) \, d\mathbf{s} \\ &= \rho(\mathbf{r}) * h(\mathbf{r}) \end{aligned} \quad (4.22)$$

Im Frequenzraum wird die Faltung zur Multiplikation, womit

$$\mathcal{F}(I(\mathbf{r})) = \tilde{I}(\mathbf{k}) = \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot o(\mathbf{k}) \quad (4.23)$$

gilt. In dieser Darstellung wird offenbart, dass lediglich Objektfrequenzen in das Bild

übertragen werden, an denen die OTF ungleich 0 ist. Alle Frequenzinformationen des Objekts, welche jenseits der Grenzfrequenz liegen, werden nicht transmittiert. Die OTF stellt hiermit also einen Tiefpassfilter für die Bildinformation dar. Werden lediglich niedrige Frequenzen übermittelt, geht hochfrequente, detaillierte Information verloren. Die Ausdehnung der OTF stellt somit ein direktes Maß für die Auflösungsbegrenzung eines Systems dar. Möchte man periodische Strukturen wiedergeben, so ist dies nur möglich, solange der Wellenvektor der Struktur $k_{xy,\rho}$ innerhalb der OTF liegt. Für Strukturen in der x - y -Ebene gilt

$$k_{xy,\rho} \leq k_{xy,\max} \quad (4.24)$$

und damit für die Periode d der Struktur

$$d_{\text{Abbe}} \geq \frac{\lambda}{2 \sin \alpha} . \quad (4.25)$$

Unter Verwendung der Vakuumwellenlänge $\lambda_0 = \lambda \cdot n$ kann man $\sin \alpha$ und den Brechungsindex n zusammenfassen zur numerischen Apertur NA.

$$d_{\text{Abbe}} \geq \frac{\lambda_0}{2NA} , \quad \text{NA} = n \sin \alpha \quad (4.26)$$

Dieser Ausdruck gibt genau die Abbe'sche Definition der Auflösung wieder.

Während die Abbe'sche Auflösungsdefinition den Frequenzraum betrachtet, existieren auch andere Auflösungsbeschreibungen, die sich am Ortsraum orientieren.

Das Rayleigh-Kriterium arbeitet auf der PSF und benennt die Länge vom Maximum der PSF zu ihrem ersten Minimum als kleinste auflösbare Distanz. Diese ist gegeben durch

$$d_{\text{Rayleigh}} \geq \frac{0,61 \lambda_0}{NA} . \quad (4.27)$$

Während man mit dem aufgezeigten Verfahren die PSFs von einfachen, bekannten optischen Systemen berechnen kann, ist in der Praxis die PSF für jedes Mikroskop individuell und abhängig unter anderem vom Objektiv, dem Brechungsindex des Einbettmediums und dem Bildgebungsstrahlengang. Daher ist es oftmals geraten, diese PSF zu messen, anstatt sie zu simulieren. Hierzu kann man ein bekanntes, kleines Objekt ρ_{cal} (möglichst kleiner als die Ausmaße der PSF) mit dem Mikroskop aufzeichnen. Die PSF des Systems ergibt sich dann aus der analytischen Entfaltung des Bildes durch das Objekt, also der Division des fouriertransformierten Bildes durch das fouriertransformierte Kalibrationsobjekt und anschließende Rücktransformation:

$$\begin{aligned} I_{\text{cal}}(\mathbf{r}) &= \rho_{\text{cal}}(\mathbf{r}) * h(\mathbf{r}) \\ &\Downarrow \\ h(\mathbf{r}) &= \mathcal{F}^{-1} \left[\frac{\tilde{I}_{\text{cal}}(\mathbf{k})}{\tilde{\rho}_{\text{cal}}(\mathbf{k})} \right] \end{aligned} \quad (4.28)$$

Dieses Verfahren ist offensichtlich nur anwendbar, wenn das Intensitätsspektrum des Kalibrationsobjektes $\tilde{\rho}_{\text{cal}}(\mathbf{k})$ auf der Fläche der OTF größer 0 ist, da sonst durch 0 dividiert wird.

Die Betrachtung der simulierten OTF (Abbildung 4.5a) zeigt, dass die Transferfunktion die prinzipiell transmittierbaren Objektfrequenzen keineswegs mit gleicher Gewichtung überträgt. Niedrigfrequente Information wird um Größenordnungen stärker übertragen als Information nahe an der Grenzfrequenz.

4.1.3 Fluoreszenzmikroskopie

Lange Zeit wurde mikroskopische Bildgebung im Wesentlichen nur in Form von Aufsicht- oder Durchlichtmikroskopie durchgeführt. Bei diesen Verfahren wird Licht auf die Probe geworfen und der reflektierte oder transmittierte Anteil dieses Lichts detektiert. Diese Mikroskopie wird im allgemeinen im sogenannten Weitfeldmodus angewandt, was bedeutet, dass stets die gesamte, sich auf den Bilddetektor abbildende, Fokusebene aufgezeichnet wird und nicht etwa die Probe Punkt für Punkt abgerastert wird. Den wesentlichen Detektor zur Aufnahme des Bildes stellte das menschliche Auge dar.

Bereits im Jahr 1904 wurden von August Köhler Leuchterscheinungen bei Beleuchtung biologischer Präparate mit kurzwelligem Licht bemerkt. Kurz darauf wurden bei Zeiss auf ultraviolettes Licht abgestimmte Fluoreszenzmikroskope entwickelt.

Da aber die hierbei angeregte Autofluoreszenz meist recht unspezifisch verteilt ist, war diese Technik nur bei Nischenanwendungen von Nutzen.

Der Durchbruch dieser Mikroskopiertechnik wurde daher erst durch die Entdeckung und Verwendung diverser Fluorophore zur Markierung von Präparaten ausgelöst. Die Fluoreszenzmikroskopie basiert auf lumineszenten, also selbst leuchtenden Lichtquellen innerhalb der Probe, welche beim Übergang von einem angeregten in einen niedrigerenergetischeren Zustand Licht ausstrahlen. Für gewöhnlich werden die Lichtquellen durch Bestrahlung mit einer von der Emission unterschiedlichen Wellenlänge in den höherenergetischen Zustand befördert. Der Hintergrund des Fluoreszenzvorgangs und der fluoreszenten Markierung von Präparaten ist zum Beispiel im Lehrbuch „Handbook of biological confocal microscopy“ von J. Pawley zu finden [5].

Zusätzlich zu biochemischen Errungenschaften, auf denen die Nutzbarmachung der Fluoreszenz beruhte, war auch der technische Fortschritt von großer Bedeutung. So waren effiziente Detektoren erforderlich, um die meist recht schwache Fluoreszenz aufzuzeichnen. Bei der Verwendung von transmittiertem oder rückgestreutem Licht hingegen stellt lediglich die thermische Belastung der Probe eine theoretische Grenze für die realisierbare Signalstärke dar. Daher war es lange üblich, die mikroskopischen Bilder mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Fotokamera auf photographischem Film aufzunehmen, da beispielsweise Bildaufnahmeröhren eine vergleichsweise geringe Sensitivität und Auflösung besaßen. Erst die breite Verfügbarkeit von CCD- (von engl. *Charge Coupled Device*) und später auch effizienten APS (*active pixel sensor*) CMOS-Kameras machte die computerunterstützte Bildbearbeitung und -analyse in der Weitfeldmikroskopie möglich. So wurden CCD-Detektoren im Jahr 1986 zum ersten Mal zur quantitativen Bildanalyse von Mikroskopiedaten eingesetzt [6]. Zum Vergleich wurden CCD-basierende Bilddetektoren bereits seit Mitte der 1970er Jahre in Spionagesatelliten verwendet [7].

Eine sehr bedeutende Entwicklung für die Fluoreszenzmikroskopie stellte das Laser-Konfokalmikroskop (CLSM von engl. *confocal laser scanning microscope*) dar, welches im Laufe der 1980er Jahre maßgeblich durch T. Wilson und C.J.R. Sheppard für die Aufzeichnung von Fluoreszenz entwickelt wurde [8]. Die Konfokaltechnik existierte bereits zuvor zur Detektion von transmittiertem Licht [9] und für die Anwendung von gut fokussierbarem Laserlicht zur Punktbeleuchtung gab es theoretische Vorarbeiten [10].

Bei der Konfokalmikroskopie wird die Probe punktweise typischerweise mit einem in das Objekt fokussierten Laserstrahl abgerastert. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch eine Blende in der Bildebene selektiert, welche sich dort am auf den Laserfokus projizierten Ort befindet. Hierdurch wird Licht ausgeblendet, welches von außerhalb des Fokus stammt (siehe Abbildung 4.6).

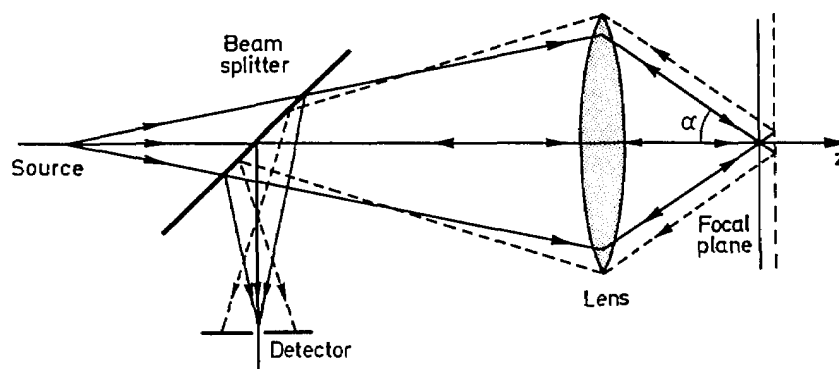


Abbildung 4.6: Schema des Funktionsprinzips des Konfokalmikroskops. Die Probe wird fokussiert beleuchtet. Das von der dieser zurückgeworfene Licht wird in der Bildebene lediglich auf der Detektorfläche aufgezeichnet wodurch Licht von außerhalb des Fokus zum Großteil ausgeblendet wird. Das Schemabild ist der Originalpublikation [8] entnommen.

Da in der Konfokalmikroskopie ein Punktdetektor verwendet wird, waren hierfür keine

pixelbasierten Bilddetektoren erforderlich. Um das Licht aufzunehmen, welches die Blende passiert, werden typischerweise Photomultiplier, seltener auch Avalanche-Photodioden (APD) verwendet. Photomultiplier waren im Gegensatz zu den obengenannten Bilddetektoren in den 1980er Jahren ausgereift, was der Konfokalmikroskopie einen entwicklungs-technischen Vorsprung gegenüber der Weitfeldmikroskopie gab.

Durch die Konfokalmikroskopie wurde es hiermit praktisch erstmals möglich, dreidimensionale Aufnahmen von biologischen Strukturen zu generieren. Diese Eigenschaft, zusammen mit der Möglichkeit, bestimmte Moleküle spezifisch mit fluoreszenten Markierungen zu versehen, führte zur raschen Verbreitung der Fluoreszenzmikroskopie in den 1990er Jahren sodass diese Methode heute ein bedeutendes Mittel in der bio-molekularen Forschung darstellt.

In dieser Arbeit werden alle durch Lichtanregung ausgelösten Lumineszenzen als Fluoreszenz bezeichnet. Es wird also keine Unterscheidung zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz vorgenommen.

4.1.4 Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde eine Reihe suprauflösender Mikroskopiemethoden entwickelt, welche eine Auflösung jenseits der Beugungsgrenze erreichen. Lässt man im Nahfeld des Lichts arbeitende Verfahren wie die optische Rasternahfeldmikroskopie (englisch *scanning nearfield optical microscope*; SNOM) [11] und Totalreflexionsmikroskopie (englisch *total internal reflection microscopy*; TIRF) (Übersichtsarbeit: [12]) außen vor, nutzen diese Techniken die besonderen Eigenschaften der Fluoreszenz, um die Beugungsgrenze zu umgehen.

Im Folgenden werden die gebräuchlichsten Methoden beschrieben.

4.1.4.1 Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie wird in der Regel nicht zu den suprauflösenden Mikroskopietechniken gezählt, da die hiermit erzeugten Bilder in der Praxis offenbar eine Auflösung im Bereich von 200 nm lateral (x,y) und 500 nm axial (z) aufweisen und damit im Auflösungsbereich der Weitfeldmikroskopie liegen.

Dennoch ist sie sehr wohl in der Lage, Bildfrequenzen zu übertragen, die jenseits der konventionellen Auflösungsgrenze liegen, weswegen sie in dieser Arbeit als suprauflösend klassifiziert ist. Da diese Generierung der erhöhten Auflösung eng verwandt mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten entfaltungsbasierten Bildrekonstruktion strukturiert beleuchteter Bilder (siehe Abschnitt 5.2) ist, wird auf diese Methode ein besonderes Augenmerk gelegt.

Die Auflösungsverbesserung des rasternden Verfahrens resultiert direkt aus der punktwweisen Beleuchtung und Detektion, ohne dass eine computergestützte Nachbearbeitung der Daten notwendig ist. Da mir keine mathematisch zufriedenstellende Herleitung der Bildgebung bei konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bekannt ist, ist eine entsprechende Herleitung der Begebenheit im Anhang dieser Arbeit aufgeführt A.3.

Man erhält für das beim Rasterungsprozess aufgezeichnete Bild $U(\mathbf{r})$

$$U(\mathbf{r}) = [\rho * h_{res}] (\mathbf{r}) \quad (4.29)$$

mit der resultierenden PSF

$$h_{res}(\mathbf{r}) = h'_{ex}(\mathbf{r}) \cdot [h_{em} * PH'] (\mathbf{r}) . \quad (4.30)$$

Hierbei ist h_{ex} der Beleuchtungsfleck in der Objektebene, auf welchen der Laser fokussiert wird, h_{em} die gewöhnliche Weitfeld-PSF und PH die Transmissionsfunktion der Blende in der Bildebene (in der Regel eine kreisförmige Rechteckfunktion in der x - y -Ebene). Der Apostroph indiziert, dass die entsprechenden Funktionen am Ursprung gespiegelt wurde, was aber in der Regel aufgrund ihrer Symmetrie keine Rolle spielt. Der Beleuchtungsfleck des perfekt fokussierten Lasers (Punktlichtquelle) gibt die PSF mit der Wellenlänge der Anregung wieder.

Für ein infinitesimal kleines Pinhole ergibt sich hiermit

$$h_{res,opt} = h'_{ex}(\mathbf{r}) \cdot h_{em} \approx h_{em}^2 . \quad (4.31)$$

Abbildung 4.7 zeigt die konfokale PSF auf der Geraden bei $z, y = 0$. Die resultierende PSF ist geringfügig schmaler als die Weitfeld-PSF. In der Praxis ist der Effekt der Quadrierung auf die resultierende PSF entlang der z -Achse von größerer Bedeutung. Die Weitfeld-PSF läuft , wie in Abbildung 4.5b zu sehen ist, außerhalb der Fokusebene kegelförmig auseinander, weswegen sich ihre Intensität dort auf eine große Fläche verteilt. Daher ist das Quadrat der Intensität hier im Vergleich zur Intensität im Fokuspunkt sehr klein. Hiermit erreicht die Konfokalmikroskopie eine gute Unterdrückung des Lichts von außerhalb des Fokus und liefert somit gut separierte Schnitte von aufgezeichneten Flächen in der x - y -Ebene (*optical sectioning*).

Obwohl der Auflösungsgewinn durch die konfokale Bildgebung bei Betrachtung der PSF gering ist (Abbildung 4.7), fällt bei der Untersuchung der Grenzfrequenzen der OTF auf, dass die Auflösungsverbesserung nach der Definition von Abbe den Faktor zwei beträgt (siehe Abbildung 4.8). Dieser Zusammenhang gilt im übrigen auch, wenn die Lochblende

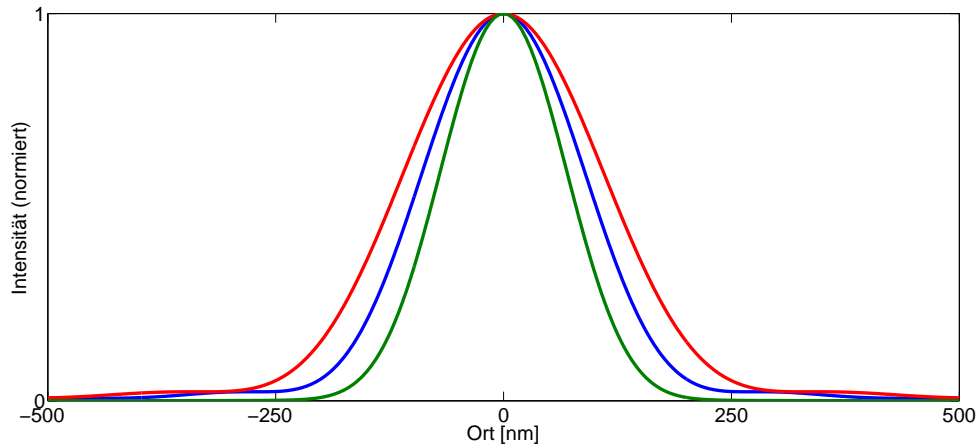


Abbildung 4.7: Bildung der PSF in der Konfokalmikroskopie. Die resultierende PSF (grün) ergibt sich aus der Multiplikation von Beleuchtungsfleck (blau) und Detektions-PSF (rot).

nicht infinitesimal weit geschlossen ist. Allerdings werden durch die resultierende konfokale OTF die Frequenzen jenseits der Beugungsgrenze nur mit sehr geringer Gewichtung übertragen.

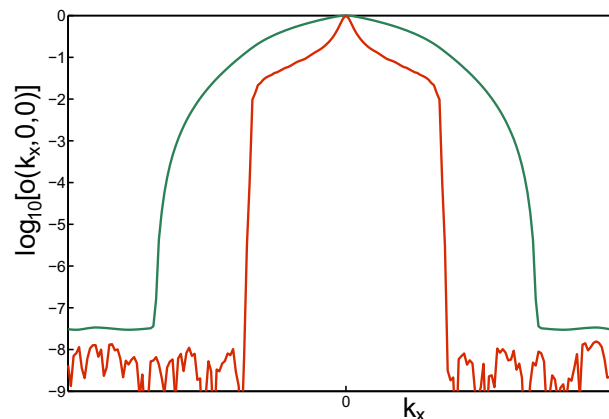


Abbildung 4.8: Vergleich von konfokaler OTF (grün) und Weitfeld-OTF (rot) in logarithmischer Darstellung in der ($\mathbf{k}_z = 0$)-Ebene. Beide Funktionen wurden auf einen Maximalwert von 1 normiert. Hochauflösende Frequenzen bis zur doppelten konventionellen Grenzfrequenz werden – wenn auch sehr schwach – übertragen. Die Fluktuationen bei sehr kleinen Werten sind auf Rundungsfehler und Unstetigkeitsartefakte durch die diskrete Fouriertransformation im Rahmen der numerischen Berechnung zurückzuführen. Die entsprechenden Funktionswerte können als 0 angesehen werden.

Dies zeigt einen Makel der gebräuchlichen Auflösungsdefinitionen an. Eine stabile Auflösungsdefinition, die die tatsächliche Ausdehnung der PSF zur Grundlage hätte, wäre beispielsweise die Standardabweichung der PSF.

4.1.4.2 STED

Die STED (von engl. *stimulated emission depletion*)-Mikroskopie [13] nutzt den quantenmechanischen Effekt der stimulierten Emission, um eine Auflösungsverbesserung zu erreichen. Es handelt sich um ein konfokal rasterndes Verfahren. Es werden hierzu zunächst

die Fluorophore im Fokus mit einem Laser angeregt. Anschließend – noch bevor sie in den Grundzustand zurückfallen – wird mit einem zweiten, gepulsten Laser, welcher im Spektrum der Fluoreszenzemission liegt, der überwiegende Anteil der Fluorophore stimuliert abgeregt. Dieser Laser wird im TEM01-Modus betrieben und hat somit im Zentrum des Strahlquerschnittes die Intensität 0. Eine andere Möglichkeit, in der Mitte der Beleuchtung ein Minimum der Intensität auch bei Nutzung eines herkömmlichen TEM00-Lasers zu erreichen, liegt in der Verwendung einer zirkularen Phasenplatte in einer konjugierten Linsenebene des Anregungsstrahls [14].

Ist der für die stimulierte Emission genutzte Laser ausreichend stark, bleiben nur Fluorophore in einer kleinen Region im angeregten Zustand, welche sich im Anschluss an den Laserpuls stochastisch abregen und dabei detektiert werden. Um genügend Signal zu detektieren muss dieser Vorgang auf jeder Fokusposition mehrfach wiederholt werden. Da der nicht abgeregte Bereich theoretisch beliebig klein sein kann, ist STED-Mikroskopie prinzipiell in der Lage, unendlich gute Auflösung zu erreichen. In der Praxis lässt sich mit STED unter guten Bedingungen jedoch nur eine Auflösung von 60 *nm* bis 80 *nm* erreichen. Die Hauptschwierigkeit besteht darin, dass bei hoher Auflösung entsprechend fein gerastert werden muss und daher durch die vielen Fluoreszenzzyklen die Fluorophore bleichen.

4.1.4.3 Mehrphotonenmikroskopie

Bei der Mehrphotonenmikroskopie [15] wird die Probe mit einem gepulsten Laser fokussiert abgerastert. Die Wellenlänge liegt dabei bei dem Doppelten der gewöhnlichen Anregungswellenlänge der Fluorophore. Bei der Zwei-Photonen-Absorption müssen zwei Photonen auf einer Zeitskala von unter einer Femtosekunde koinzident von einem Fluorophor absorbiert werden. Die Wahrscheinlichkeit der Zweiphotonenabsorption ist proportional zum Quadrat der Photonenwahrscheinlichkeitsdichte, also der Intensität. Fokussiert man beugungsbegrenzt in die Probe, hat die Fluoreszenzanregung eine Wahrscheinlichkeitsdichte von h_{ex}^2 . Hier ergibt sich also der selbe Effekt, wie bei der Konfokalmikroskopie. Ist die Detektion ebenfalls konfokal, erhält man $h_{res} = h_{ex}^2 \cdot h_{det}$. Da allerdings die Anregungswellenlänge in der Regel deutlich länger als die Emissionswellenlänge ist, ergibt sich in der Praxis keine im Vergleich zur Konfokalmikroskopie erhöhte Auflösung. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass das zur Anregung verwendete infrarote Licht für gewöhnlich gut in tiefes Gewebe eindringen kann und weniger stark gestreut wird. Zudem wird durch die quadratische Intensitätsabhängigkeit selektiv die Fokusebene angeregt, weswegen es praktisch kein Signal von außerhalb der Fokus gibt. Daher kann in der Detektion eine sehr weit geöffnete Blende verwendet werden.

4.1.4.4 Lokalisationsmikroskopie

Die Lokalisationsmikroskopie basiert darauf, Fluorophore separiert sichtbar zu machen. Bereits früh wurde eine solche Separation kleiner Regionen durch spektrale Trennung erreicht (SPDM; spektrale Präzisions-Distanz-Mikroskopie) [16, 17]. Hierzu wurden nah beieinander liegende, kleine Chromatinregionen innerhalb des Zellkerns mit spektral unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Bei der sequentiellen Aufnahme der beiden Fluorophore wurde dadurch eine markierte Region nach der anderen separiert sichtbar. Der Schwerpunkt dieser Regionen konnte daher mit hoher Genauigkeit detektiert werden, wodurch eine Distanzmessung der Regionen weit unterhalb der Beugungsgrenze möglich wurde. Eine Limitation dieser Technik liegt allerdings in der geringen möglichen Anzahl spektral trennbarer Fluorophore in einer Probe. Später wurde stochastisches An- und Ausschalten von einzelnen Fluorophoren angewandt, um diese temporal in einer Serie von Aufnahmen bei verschiedenen Zeitpunkten statt spektral zu trennen. Um dies zu erreichen, wurden mehrere Methoden entwickelt. So lassen sich photoaktivierbare [18, 19] und photoschaltbare [20] Fluoreszenzmoleküle verwenden um immer nur so viele Fluorophore zu aktivieren, dass diese im Bild räumlich separiert sind. Da die einzelnen Fluorophore stochastisch ausbleichen, müssen immer wieder neue Moleküle in den anregbaren Zustand überführt werden. Ein weiterer Ansatz basiert auf der Verwendung konventioneller Farbstoffe [21]. Viele konventionelle Fluorophore können durch die Verwendung verhältnismäßig hoher Lichtleistung der Anregung in einen metastabilen Zustand gebracht werden, aus dem sie nach einigen Sekunden oder Minuten wieder zurückkehren. In der Zwischenzeit sind diese Fluorophore also nicht sichtbar. Bei diesem Ansatz wird die Probe in der Regel kontinuierlich mit hoher Laserleistung bestrahlt. Kehrt ein Fluorophor in den Grundzustand zurück, wird dieses innerhalb von Bruchteilen einer Sekunde ausgebleicht und erscheint in dieser Zeit hell leuchtend auf der kontinuierlich laufenden Kamera.

4.1.4.5 Strukturierte Beleuchtung

Bei der Mikroskopiemethode der strukturierten Beleuchtung (SIM von engl. *structured illumination microscopy*) wird die Probe mit einem in der Regel periodischen Muster beleuchtet, um hierdurch eine Verbesserung der Auflösung zu erreichen. Ein Spezialfall dieser Technik ist die Beleuchtung von beiden Seiten durch zwei gegenüberliegende Objektive (SMI; engl. *spatially modulated illumination*). Das erzeugte Interferenzmuster hat hierdurch eine sehr kleine Wellenlänge, weswegen Größeninformation weit jenseits der Beugungsgrenze erhalten werden kann [22]. Zur Erzeugung von hochauflösenden Bildern eignet sich SMI jedoch in der Regel nicht. Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist in der Dissertation von David Baddeley [23] und in [24] zu finden.

Für gewöhnlich wird das Objekt allerdings nur durch ein Objektiv beleuchtet (SIM) [25, 26]. In diesem Fall ist es möglich, Bilder mit einer um den Faktor 2 verbesserten Auflösung

zu generieren. Die mathematischen Grundlagen dieser Auflösungsverbesserung sind in Kapitel 4.2 zu finden.

4.1.5 Rauschen

Bis jetzt wurde lediglich die Intensität als kontinuierliche Verteilung bearbeitet. Hierbei spielt es keine Rolle, mit welcher Gewichtung das Objektspektrum übertragen wird, solange es innerhalb des übertragbaren Frequenzbereichs liegt. Als Konsequenz hieraus ist beispielsweise auch die Konfokalmikroskopie supraauflösend mit einer Auflösungsverbesserung um einen Faktor 2. In der Praxis ist aber die Bildintensität aus fundamentalen physikalischen Gründen nicht fehlerfrei messbar. Diese Störung des Signals, das Rauschen, hat mehrere Ursachen.

4.1.5.1 Photonenrauschen

Selbst wenn der Detektor keinerlei Rauschen aufweist, was zum Beispiel bei einem Photomultiplier annähernd der Fall ist, wird durch die Quantennatur des Lichts ein inhärenter Messfehler verursacht.

Die Lichtintensität, das Betragsquadrat der Lichtwelle, ist lediglich proportional zur Wahrscheinlichkeitsdichte der Photonen. Möchte man die Intensität messen, erhält man im Idealfall lediglich eine diskrete Zahl an Photonen (multipliziert mit ihrer Energie geteilt durch die Messfläche und die Messzeit). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird zur Vereinfachung die Intensität einheitslos auf den Erwartungswert der Photonenzahl normiert. Zeit- und Flächenabhängigkeiten werden daher ignoriert und der hierbei verwendete Intensitätsbegriff bezeichnet eher eine Energie und richtigerweise den Erwartungswert der gemessenen Photonenzahl $\langle n \rangle$.

Der Erwartungswert der Photonenzahl für einen Detektor am Ort \mathbf{r}_i ist gegeben durch

$$\langle n \rangle (\mathbf{r}_i) = \iint \frac{I(x, y, z_i) \cdot \tau \cdot A(x - x_i, y - y_i) \cdot R(\nu)}{h\nu} dx dy \quad (4.32)$$

mit der Messdauer τ , der Photonenfrequenz ν , dem plankschen Wirkungsquantum h , der Photoneneffizienz des Detektors $R(\nu)$ als Funktion der Lichtfrequenz mit Werten zwischen 0 und 1 und der aktiven Flächenfunktion des Detektors A (zum Beispiel eine zweidimensionale Rechteckfunktion).

Zur Vereinfachung kann man Intensität und Detektorfläche zur Leistung kombinieren.

$$P(x_i, y_i, z_i) = \iint I(x, y, z_i) \cdot A(x - x_i, y - y_i) dx dy = I(x_i, y_i, z_i) *_{x,y} A'(x_i, y_i) \quad (4.33)$$

$*_{x,y}$ bezeichnet die Faltung in der x - y -Ebene. Hiermit ist also der Erwartungswert der Photonen proportional zur Leistung auf dem Detektor.

$$\langle n \rangle(\mathbf{r}_i) = \frac{p(\mathbf{r}_i) \cdot \tau \cdot R(\nu)}{h\nu} \quad (4.34)$$

$$\langle n \rangle(\mathbf{r}_i) \propto p(\mathbf{r}_i) \quad (4.35)$$

Diese Photonen treffen nach und nach mit ihrer durch Leistung und Photoneneffizienz vorgegebenen durchschnittlichen Rate zufällig auf den Detektor. Somit unterliegt die innerhalb des Zeitintervalls τ detektierte Anzahl der Poissonverteilung mit der Wahrscheinlichkeit p für einen Messwert n von

$$p_{\text{Poisson}}(n) = \frac{\langle n \rangle^n}{n!} e^{-\langle n \rangle} . \quad (4.36)$$

Der Fehler der Messung als Standardabweichung der Poissonverteilung ist

$$\sigma_{\text{Poisson}} = \sqrt{\langle n \rangle} . \quad (4.37)$$

Somit ist der zu erwartende relative Fehler durch

$$\frac{\sigma_{\text{Poisson}}}{\langle n \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle n \rangle}} . \quad (4.38)$$

gegeben. Hiermit kann der Einfluss des Photonenrauschens durch eine Erhöhung der Lichtleistung reduziert werden. Dies kann man durch bestrahlung der Probe mit erhöhter Anregungsintensität erreichen. Aufgrund der Wurzelabhängigkeit ist es allerdings in der Fluoreszenzmikroskopie praktisch unmöglich, das Quantenrauschen durch Erhöhung der Lichtleistung auf ein vernachlässigbares Niveau zu bekommen.

4.1.5.2 Kamerarauschen

Zusätzlich zum Photonenrauschen wird in der Regel auch durch den Detektor eine Verfälschung des Signals hervorgerufen. Bei CCD Kameras, welche in der beschriebenen Arbeit verwendet wurden, ist dieses unabhängig von der detektierten Photonanzahl. Die folgende Beschreibung des Rauschens basiert auf der verwendeten Kamera, einer gekühlten CCD-Kamera (PCO sensicam qe), welche mit dem ICX285AL Sensor von Sony arbeitet.

Das durch die Kamera erzeugte Rauschen lässt sich wiederum in zwei Anteile zerlegen:

4.1.5.3 Dunkelstromrauschen

Das Dunkelstromrauschen ist das falsch positive Signal während der Aufnahmedauer thermisch ausgelöster Ladungspaare. Dieses unterliegt ebenfalls der Poisson'schen Wahrscheinlichkeitsverteilung. Da es thermisch ausgelöst wird, kann man ihm gut durch Kühlen des Detektors entgegenzutreten. Daher sind hochwertige Kameras, wie sie auch in der beschriebenen Arbeit verwendet wurden, aktiv gekühlt (hier auf -12°C). Dies wird in der Regel mit einem Peltier-Element realisiert. Die durch dieses abgeführte Wärme wird zusammen mit der Verlustwärme des Peltier-Elements auf einen Kühlkörper übertragen, welcher in der Regel durch einen Luftstrom gekühlt wird. Es gibt allerdings auch Kameras, die zu diesem Zweck an einen Kühlwasserkreislauf angeschlossen sind. Die in allen Aufbauten verwendete Kamera (PCO Sensicam qe) weist eine Dunkelstromrate von $< 0,1e^-/s$ auf, womit diese Rauschquelle bei den genutzten Aufnahmedauern von unter einer Sekunde zu vernachlässigen ist.

4.1.5.4 Ausleserauschen

Während des Auslesevorgangs beim Schieben der Pixelladungen durch die Schieberegister und beim anschließenden Verstärken und digitalisieren des Signals treten Fehler auf. Dieses, durch einen komplexen Zufallsprozess erzeugte, Rauschen lässt sich als normalverteilt annehmen. Das Ausleserauschen der verwendeten Kamera ist mit einer Standardabweichung von 4 bis $5e^-$ angegeben. Man nimmt hierbei für gewöhnlich an, dass das Rauschen um 0 schwankt und nimmt einen zusätzlichen konstanten Schwellwert (*offset*) der Kamera an.

$$p_{\text{readout}}(n) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_{\text{readout}}} e^{-\frac{n^2}{2\sigma_{\text{readout}}^2}} \quad (4.39)$$

4.1.5.5 Gesamtrauschen

Die Abweichung einer gemessenen Photonenzahl vom Erwartungswert auf einem Pixel ergibt sich aus der Kombination der einzelnen Abweichungen. Die Standardabweichungen durch die verschiedenen Rauschquellen addieren sich quadratisch, da sie unabhängig voneinander sind.

$$\sigma_{\text{gesamt}} = \sqrt{\sigma_{\text{Poisson}}^2 + \sigma_{\text{readout}}^2} \quad (4.40)$$

Da sich die kombinierte Wahrscheinlichkeit für einen Messwert im Sinn von

$$p_{\text{comb}}(n) = \sum_{i=0}^n p_{\text{Poisson}}(i) \cdot p_{\text{readout}}(n-i) \quad (4.41)$$

nicht ohne weiteres vereinfachen lässt, ist es für die Modellierung des Rauschens von Vorteil, wenn eine Ursache überwiegt und man daher die andere vernachlässigen kann.

Ein typischer Wert für die Photonenzahl auf einem Pixel in der Fluoreszenzmikroskopie ist 1000. In diesem Fall beträgt die Standardabweichung durch das Photonenrauschen 31,6 welches hiermit wesentlich einflussreicher als das Ausleserauschen ist (die kombinierte Standardabweichung ergibt etwa 31,9).

Daher kann das Rauschmodell in der Regel als rein poissonverteilt angenähert werden. Modernere wissenschaftliche Kameras (EMCCD, (s)CMOS) besitzen eine Signalverstärkung auf Pixelbasis, also vor dem Auslesevorgang, wodurch der Einfluss des Ausleserausches weiter reduziert werden kann.

4.1.6 Abtastrate

Bei der Bildgebung von Strukturen in der Mikroskopie, insbesondere bei der Weitfeldmikroskopie mithilfe eines flächigen Bilddetektors, ist der beobachtbare Bildausschnitt begrenzt. Während es mit guten Objektiven mit einer hohen Vergrößerung von 60 oder 100 durchaus möglich ist, Flächen mit einem Durchmesser von über 200 μm abzubilden [27], wird in der Regel durch die begrenzte Pixelanzahl geeigneter Kameras eine Limitierung herbeigeführt.

Das Nyquist-Shannon'sche Abtasttheorem gibt vor, dass zur Übertragung von Information durch ein diskret abtastendes System die höchste Frequenz f_{max} der Information maximal das Hälfte der Abtastfrequenz f_s betragen darf.

$$f_s \geq 2 f_{\text{max}} \quad (4.42)$$

Bei der Anwendung der Abtasttheorems auf die Mikroskopie ist allerdings zu beachten, dass die einzelnen Pixel der Kamera nicht diskret an jeweils einem Punkt die Intensitätsverteilung des Bildes abtasten, sondern jeweils die Gesamtintensität auf einer Fläche aufintegrieren, welche (bei guten Kameras) nahe an dem Quadrat des Pixelabstandes liegt. Im Ortsraum ergibt die Integration der Intensität über die Pixelfläche eine Kreuzkorrelation bzw. aufgrund der Symmetrie der Pixel eine Faltung der Intensität mit der Pixelfläche. Betrachtet man diesen Effekt im Fourier-Bild, fällt auf, dass die Ortsfrequenzen des Bildes mit einer Fourier-transformierten Rechteckfunktion, also einem Sinus cardinalis (Sinc-Funktion) multipliziert werden, welcher seinen ersten Nulldurchgang bei der Abtastfrequenz hat. Informationen mit der halben Abtastfrequenz werden mit der Gewichtung 0,64 übertragen.

Das Bildrauschen ist im allgemeinen nicht frequenzabhängig während die hohen Frequenzen des Signals allerdings in der Regel wesentlich schwächer als die niedrigen Frequenzen

sind. Daher ist der relative Einfluss des Rauschens auf die hohen Bildfrequenzen – also auf die Frequenzen, die die interessante, hochauflösende Information repräsentieren – sehr viel größer als auf die niedrigen.

Unter diesem Gesichtspunkt wird es gelegentlich empfohlen, zur Bilddetektion mit Pixeldetektoren eine gewisse Überabtastung anzuwenden. Ein anderer Grund für Überabtastung in der Mikroskopie ist die Tatsache, dass oft ein breites Wellenlängenspektrum des Lichts verwendet wird. Da die Auflösung proportional zur verwendeten Wellenlänge ist, führt die Orientierung der Abtastung an der Auflösung mit der kürzesten zur Verfügung stehenden Wellenlänge zwangsläufig zu einer Überabtastung für größere Wellenlängen.

In der Praxis werden in der hochauflösenden Lichtmikroskopie daher Pixelabstände (projiziert auf die Bildebene) im Bereich zwischen 60 und 80 nm verwendet.

Bei gängigen Pixelzahlen von etwa 500 bis 2000 Pixeln entlang der kürzeren Seite des Chips ergibt sich hiermit ein Durchmesser des aufnehmbaren Bereichs von lediglich 30 bis 160 μm .

4.1.7 Entfaltung von Mikroskopiedaten

Wie bereits bei der Betrachtung der Raumfrequenzgewichtung durch die OTF in der Weitfeld- und Konfokalmikroskopie (siehe Abbildung 4.8) ersichtlich wurde, werden hochauflösende Objektfrequenzen deutlich abgeschwächt übertragen. Da sie nur geringfügig in das Bild einfließen ist ihr auflösungsverbessernder Einfluss kaum wahrzunehmen. Das Unternehmen, diese verfälschte Gewichtung rückgängig zu machen und dadurch in den gegebenen Auflösungsgrenzen (und darüber hinaus, was nur mit *a priori* Annahmen über das Objekt möglich ist,) die Raumfrequenzen des Bildes homogen zu übertragen, wird mit dem Begriff **Entfaltung** bezeichnet. Es wird hierbei also versucht, den punktverbreiternden Effekt der PSF rückgängig zu machen. Ein Überblick über gebräuchliche Entfaltungsmethoden in der Mikroskopie ist in [28] und [29] zu finden.

Es ist grundsätzlich zwischen zwei Herangehensweisen zu unterscheiden:

4.1.7.1 Inverses Filtern

Unter der Voraussetzung der Positivität der OTF o ist es analytisch möglich, Gleichung 4.23 nach dem Objekt aufzulösen zu

$$\tilde{\rho}_{\text{theo}}(\mathbf{k}) = \frac{\tilde{I}(\mathbf{k})}{o(\mathbf{k})}. \quad (4.43)$$

In der Praxis ist die PSF allerdings bandbegrenzt, weswegen dies nur innerhalb

der Übertragungsgrenzen der OTF möglich wäre. Allerdings ist auch unter der Berücksichtigung der Grenzen die Berechnung des Objektes aus dem Bild unter Kenntnis der PSF ein schlecht gestelltes Problem, da die Genauigkeit der Aufzeichnung der Bildintensität durch das Rauschen limitiert ist. Bei hohen Frequenzen, an denen die OTF kleine Werte aufweist, würde hiermit das Rauschen übermäßig verstärkt. Daher wird bei einem solchen Vorgehen, welches inverses Filtern genannt wird, ein zusätzlicher Gewichtungsfaktor (Regularisierung) angewandt, der bei niedrigen Werten der PSF der Verstärkung des Rauschens entgegenwirkt. Unter der Annahme, dass das Rauschen normalverteilt und ortsunabhängig ist und das Objekt vollkommen unbekannt ist (und somit auch negative Werte beinhalten kann), liefert die sogenannte Wiener-Entfaltung hierbei das bestmögliche Ergebnis. Für die korrekte Anwendung des Wiener-Filters ist allerdings die Kenntnis des Leistungsdichtespektrums des Objekts (die fouriertransformierte Autokorrelation $\tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot \tilde{\rho}^*(-\mathbf{k})$) notwendig. Dieses ist aber im Allgemeinen unbekannt und muss abgeschätzt werden. Häufig wird ein konstantes Leistungsdichtespektrum angenommen. Im Frequenzraum arbeitende *ad hoc* Entfaltungsmethoden sind wenig rechenaufwändig und daher sehr schnell durchzuführen. Allerdings kann hierbei nur additives Rauschen betrachtet werden und zudem ist die Berücksichtigung der Ortsabhängigkeit des Rauschens nicht möglich. Lediglich die Frequenzabhängigkeit des Rauschens kann beachtet werden, was allerdings bei weißem Rauschen (z.B. Poisson-Rauschen) unerheblich ist. Daher können inverse Filter lediglich bei relativ homogenen Bildern näherungsweise das Rauschen korrekt berücksichtigen. Eine weitere Schwachstelle dieser Methoden ist die Tatsache, dass die Annahme der Nichtnegativität des Objekts nicht in das Modell integriert werden kann. Somit weisen invers gefilterte Bilder in dunklen Bereichen in der Regel Restrauschen auf, welches um 0 schwankt.

4.1.7.2 Iteratives Entfalten

Die nichtlineare Bedingung der Nichtnegativität des Objekts kann in nichtlinearen iterativen Verfahren angewandt werden. Hierbei wird in jedem Iterationsschritt das Objekt so verändert, dass es bei einer Faltung mit der PSF das aufgenommene Bild besser beschreibt als die letzte Annahme. Hierzu wird das aktuell geschätzte Objekt mit der PSF gefaltet (Vorwärtssimulation) und mit dem Bild verglichen. Damit lässt sich eine Änderungsfunktion berechnen, welche wiedergibt, inwiefern sich das Bild Pixel für Pixel verändern muss. Anschließend wird diese Änderung wieder in den Objektraum projiziert durch Faltung mit der (gespiegelten) PSF (Rückwärtssimulation). Die erhaltene Objektänderung wird angewandt und der nächste Schritt wird vollzogen.

Die Nichtnegativität kann hierbei inhärent durch die Änderungsfunktion erfolgen (z.B. Richardson-Lucy) oder durch einen zusätzlichen Regularisierungsterm. Eine Besonderheit iterativer Verfahren stellt die Tatsache dar, dass die Änderungsfunktion direkt aus

der Wahrscheinlichkeitsverteilung des Rauschens hergeleitet werden kann, um das unter Voraussetzung des Rauschmodells bestmögliche Ergebnis zu erhalten (*maximum likelihood*, ML). Hierzu wird das Wahrscheinlichkeitsfunktional für eine gegebene Intensitätsverteilung unter der Voraussetzung des gegebenen Bildes aufgestellt, das sogenannte Likelihoodfunktional. Ziel ist es nun, die vorwärtssimulierte Intensitätsverteilung zu erreichen, die dieses Funktional maximiert.

Im Anhang A.4 ist anhand eines einfachen Beispiels von zwei Messpunkten aufgezeigt, wie sich das Likelihoodfunktional gestaltet und sich daraus das neg-log-Likelihoodfunktional ergibt, welches es zu minimieren gilt. Die Extremwertbestimmung kann über ein gradientenbasiertes Verfahren erfolgen, um Schritt für Schritt dem Extremwert entgegenzustreben.

Durch die Möglichkeit, das korrekte oder ein näherungsweise korrektes Rauschmodell voranzusetzen und außerdem die Nichtnegativität des Objekts zu berücksichtigen, sind iterative Verfahren den linearen *ad hoc*-Verfahren überlegen, was das erreichte Ergebnis angeht. Der Nachteil dieser Methoden liegt allerdings in der Tatsache, dass eine große Anzahl an Iterationen erforderlich ist, um zum Ergebnis zu konvergieren.

Da auch iterative Verfahren auf dem gemessenen fehlerbehafteten Bild beruhen, pflanzt sich dieser Fehler auf das Ergebnis, den Konvergenzpunkt fort. Dieser Fehler wird hierbei verstärkt (Beispiel siehe Anhang A.4), da das wahrscheinlichste Objekt jenes ist, welches das rauschbehaftete Bild in der Vorwärtssimulation erzeugt. In der Praxis ist daher das konvergierte Resultat extrem verrauscht. Hiermit ist es notwendig, bei der Entfaltung einen Regularisierungsterm zu verwenden, welcher dem Rauschen durch Glättung des Objektes entgegenwirkt.

Mathematisch ist die Regularisierung als zusätzliche *a priori* Information über das Objekt zu verstehen. Nach dem Satz von Bayes ergibt sich hieraus für die logarithmierte bedingte Wahrscheinlichkeit die Addition von logarithmierter Likelihoodfunktion und Regularisierungsfunktion. Hiermit kann die Regularisierung in Form eines zusätzlichen additiven Terms zur neg-log-Likelihoodfunktion hinzugefügt werden. Wird eine Regularisierung verwendet, spricht man in der Regel von *maximum a posteriori* (MAP) statt von ML. Als Regularisierung wird häufig eine normalverteilte (Good's Roughness) oder exponentialverteilte (Total Variation) Ähnlichkeit benachbarter Objektpunkte (hier mit ρ_i und ρ_j gekennzeichnet) vorausgesetzt. Die Regularisierung kann außerdem Objektinformationen erzeugen, die außerhalb der OTF liegen, da sie direkt auf dem Objekt arbeitet.

$$p_{a\ priori, GR}(\rho_i) \propto e^{-\lambda(\rho_i - \rho_j)^2} \tag{4.44}$$

$$p_{a\ priori, TV}(\rho_i) \propto e^{-\lambda|\rho_i - \rho_j|} \tag{4.45}$$

Zu beachten ist, dass die Glättung des Objektes, also die Annahme, dass sich benachbarte Punkte im Objekt ähneln, gerade in der Fluoreszenzmikroskopie keine Rechtfertigung besitzt, da das Objekt prinzipiell aus Punktlichtquellen zusammengesetzt ist. Eine andere Methode der Regularisierung liegt darin, die Entfaltung ab einem gewissen Punkt abzubrechen um die Konvergenz zum Rauschen hin zu unterbinden und mit dem ungefähren, noch etwas unscharfen Ergebnis vorlieb zu nehmen. Die resultierende Differenz zwischen der erreichten Likelihood und der Likelihood im Konvergenzpunkt ist hiermit der „angewandte“ Regularisierungsterm. Diese Regularisierung durch frühzeitigen Abbruch ist als Tiefpassfilter zu sehen, da niederfrequente Objektinformation schneller konvergiert, als hochfrequente aufgrund ihrer stärkeren Übertragung durch die OTF.

4.1.8 Verschiebungsbestimmung von Bildern durch Phasenkorrelation

In der Mikroskopie ist es häufig notwendig, die Verschiebung zweier Bilder zu berechnen. Wenn beispielsweise Bilder eines Objekts bei verschiedenen Wellenlängen vorliegen, sind diese durch chromatische Aberration oder durch mechanische Bewegungen (sofern die Bilder sequentiell aufgezeichnet werden) in der Regel leicht zueinander verschoben. Wenn sich die Bildinformation hierbei in beiden Bildern ähnelt, kann anhand dieser die Verschiebung bestimmt werden um sie im Anschluss zu korrigieren. Im Rahmen der beschriebenen Arbeit musste sowohl für die Bildzusammenführung, als auch für die Rekonstruktion der mit dem Ophthalmoskop aufgenommenen Bilder eine Verschiebungsbestimmung vorgenommen werden.

Hierzu gibt es ein robustes, effizientes Verfahren, welches mit Nutzung der Fouriertransformation arbeitet: die **Phasenkorrelation**. In der Fouriertransformation übersetzt sich die Ortsinformation in den Phasenanteil, während die Amplitudeninformation im Amplitudenanteil steckt.

Angenommen, es liegen zwei zueinander verschobene, sonst aber identische Bilder vor. Die Verschiebung des Bildes Im_1 relativ zum Bild Im_0 um den Vektor \mathbf{r}_s kann durch eine Faltung mit der Deltadistribution beschrieben werden.

$$Im_1(\mathbf{r}) = Im_0(\mathbf{r} - \mathbf{r}_s) = Im_0(\mathbf{r}) * \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_s) \quad (4.46)$$

Die Phasenkorrelation R ist gegeben durch die inverse Fouriertransformierte des durch sein Amplitudenspektrum normierten Kreuzleistungsspektrums. Sie ist somit die Kreuzkorrelation, welche im Fourierraum durch das Betragsquadrat geteilt wird.

$$R(\mathbf{r}) = \mathcal{F}^{-1} \left(\frac{\widetilde{Im}_0(\mathbf{k}) \cdot \widetilde{Im}_1^*(\mathbf{k})}{|\widetilde{Im}_0(\mathbf{k}) \cdot \widetilde{Im}_1^*(\mathbf{k})|} \right) \quad (4.47)$$

Nun kann man (4.46) einsetzen und Faltungstheorem und Deltadistribution in Exponentialdarstellung anwenden.

$$\begin{aligned}
 R(\mathbf{r}) &= \mathcal{F}^{-1} \left(\frac{\widetilde{I}m_0(\mathbf{k}) \cdot \widetilde{I}m_0^*(\mathbf{k}) \cdot e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}_s}}{|\widetilde{I}m_0(\mathbf{k}) \cdot \widetilde{I}m_0^*(\mathbf{k}) \cdot e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}_s}|} \right) \\
 R(\mathbf{r}) &= \mathcal{F}^{-1} \left(\frac{\widetilde{I}m_0(\mathbf{k}) \cdot \widetilde{I}m_0^*(\mathbf{k}) \cdot e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}_s}}{\widetilde{I}m_0(\mathbf{k}) \cdot \widetilde{I}m_0^*(\mathbf{k})} \right) \\
 R(\mathbf{r}) &= \mathcal{F}^{-1} (e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}_s}) = \delta(\mathbf{r} + \mathbf{r}_s) \tag{4.48}
 \end{aligned}$$

Im Fall perfekter Bilder erhält man also einen Deltapeak, der direkt die (negative) Verschiebung anzeigt. Sind die beiden Bilder nicht genau identisch, zudem mit der PSF gefaltet und von Rauschen beeinflusst, ist der Peak verbreitert und der Rest der Phasenkorrelation fluktuiert um 0. In der Regel ist diese Methode dennoch sehr zuverlässig. Die genaue Positionsbestimmung des Peaks kann man z.B. mithilfe einer Schwerpunktbestimmung realisieren.

4.2 Grundlagen der strukturierten Beleuchtung

4.2.1 Bildentstehung bei strukturierter Beleuchtung

4.2.1.1 Beleuchtungsmuster

Bei strukturierter Beleuchtung wird ein periodisches Muster auf das Objekt projiziert. Egal, ob das Muster mithilfe eines Interferometers oder mit einem Gitter in einer Zwischenbildebene im Beleuchtungsstrahlengang erzeugt wird, kann man die Entstehung des Beleuchtungsmusters durch Interferenz mehrerer kohärenter Wellen beschreiben. Im Folgenden wird die Bildentstehung, die Auflösungsverbesserung und der frequenzraum-basierte Lösungsansatz für ein Interferenzmuster welches sich aus einer Summe beliebig orientierter kohärenter Lichtstrahlen ergibt, hergeleitet. Durch die Generalität des Lösungsansatzes und die daraus resultierenden Summennotationen büßt diese Herleitung etwas an Übersichtlichkeit ein. Eine Herleitungen, die sich auf bestimmte, einfachere Interferenzmuster beschränkt, ist beispielsweise in [2] und [24] zu finden.

Die Wellenfunktion Ψ des elektrischen Feldes in der Bildebene ist eine Summe von m ebenen Wellen mit Amplitude \mathbf{a}_i , Wellenvektor \mathbf{k}_i und Phase ϕ_i . Die Amplitude ist hier vektoriell, da die Polarisation der Welle ihre Amplitude integriert wurde. Der Amplitudenvektor steht senkrecht zum Wellenvektor. Alle einzelnen Wellen besitzen die gleiche Wellenlänge. Der Betrag der Wellenvektoren ist also für alle Wellen gleich.

$$|\mathbf{k}_i| = |\mathbf{k}_j| = k, \quad (4.49)$$

$$\Psi(\mathbf{r}, t) = \sum_{i=1}^m \mathbf{a}_i e^{i(\mathbf{k}_i \mathbf{r} - \phi_i - \omega t)} \quad (4.50)$$

Die für die Fluoreszenz ausschlaggebende Intensität der Beleuchtung ist durch das Betragsquadrat der Wellenfunktion gegeben.

$$Illu(\mathbf{r}) = |\Psi|^2 = \Psi \cdot \Psi^* \quad (4.51)$$

$$\begin{aligned} Illu(\mathbf{r}) &= \sum_{i=1}^m \mathbf{a}_i e^{i(\mathbf{k}_i \mathbf{r} - \phi_i - \omega t)} \cdot \sum_{j=1}^m \mathbf{a}_j e^{-i(\mathbf{k}_j \mathbf{r} - \phi_j - \omega t)} \\ &= \sum_{i,j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i(\mathbf{k}_i \mathbf{r} - \phi_i - \omega t)} e^{-i(\mathbf{k}_j \mathbf{r} - \phi_j - \omega t)} \\ &= \sum_{i,j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} \end{aligned} \quad (4.52)$$

Die Doppelsumme läuft über jede Kombination von i und j , besteht also aus m^2 Summanden. Um diese Gleichungen weiter aufzulösen, wird die Summe aufgeteilt in eine Summe $\sum_{i=j}$, welche alle Kombinationen mit $i = j$ enthält, eine Summe $\sum_{i < j}$ mit allen Kombinationen, in welchen i kleiner als j ist, und eine Summe $\sum_{i > j}$, welche alle Summanden mit $i > j$ beinhaltet. $\sum_{i=j}$ besteht aus m Summanden, während $\sum_{i < j}$ und $\sum_{i > j}$ jeweils aus $(m^2 - m)/2$ Summanden besteht.

$$\begin{aligned} Illu(\mathbf{r}) &= \sum_{i=j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} \\ &\quad + \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} + \sum_{i > j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} \\ Illu(\mathbf{r}) &= \sum_i \mathbf{a}_i^2 + \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} + \sum_{i > j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{-i([\mathbf{k}_j - \mathbf{k}_i] \mathbf{r} - \phi_j + \phi_i)} \end{aligned} \quad (4.53)$$

In der letzten Doppelsumme lassen sich die Indizes vertauschen, was es ermöglicht, deren Summanden in die andere Doppelsumme mit $i < j$ zu integrieren.

$$Illu(\mathbf{r}) = \sum_i \mathbf{a}_i^2 + \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} + \sum_{j > i} \mathbf{a}_j \mathbf{a}_i e^{-i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} \quad (4.54)$$

$$Illu(\mathbf{r}) = \sum_i \mathbf{a}_i^2 + \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j (e^{i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} + e^{-i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)}) \quad (4.55)$$

$$Illu(\mathbf{r}) = \sum_i \mathbf{a}_i^2 + 2 \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j \cos([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j) \quad (4.56)$$

Im Gegensatz zur obigen Darstellung (4.52) ist nun ersichtlich, dass die Intensität keine komplexen Werte annehmen kann. Mit dieser Formel ist es nun möglich, das Beleuchtungsmuster für jede beliebige Kombination kohärenter Strahlen zu berechnen. Obwohl es prinzipiell möglich ist, beliebige Beleuchtungsmuster zu verwenden, ist es in der Praxis sinnvoll, ein möglichst einfaches Muster mit einer geringen Anzahl an Ordnungen zu nutzen. Je niedriger die Anzahl der Ordnungen ist, je geringer ist auch die erforderliche Anzahl an Einzelbildern, wie in Abschnitt 4.2.2 gezeigt wird.

4.2.1.2 Bildentstehung

Die Fluoreszenzstärke (Intensität) des Gegenstandes in der Objektebene I_g ist proportional zur Fluorophordichte ρ . Bei gewöhnlicher Fluoreszenzmikroskopie sind die Fluorophore nicht annähernd in Sättigung. Die Besetzungszahl des Grundzustandes ist also wesentlich größer, als die des angeregten Zustandes oder eventueller Zwischenzustände. In diesem Fall ist die Stärke der Fluoreszenz annähernd proportional zur Intensität der Beleuchtung $Illu$ und es gilt für die Intensität des vom Gegenstand emittierten Lichts

$$I_g(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) \cdot Illu(\mathbf{r}) . \quad (4.57)$$

Es wird angenommen, dass das Fluoreszenzlicht von jedem Punkt im Objektraum isotrop ausgestrahlt wird. Die Intensität im Bildraum I_b ergibt sich aus der Faltung der Gegenstandsintensität mit der Punktbildfunktion h .

$$I_b(\mathbf{r}) = [(\rho \cdot Illu) * h](\mathbf{r}) . \quad (4.58)$$

Das Faltungsintegral lässt sich in der Praxis häufig sowohl numerisch als auch analytisch mithilfe einer Transformation in der Fourier-Raum berechnen. In der Fouriertransformierten geht die Faltung in eine Multiplikation und umgekehrt über. Es gilt:

$$\tilde{I}_b(\mathbf{k}) = [(\tilde{\rho} * \tilde{Illu}) \cdot o](\mathbf{k}) \quad (4.59)$$

mit der optischen Transferfunktion $o = \tilde{h}$ als der Fouriertransformierten der Punktbildfunktion.

Die Fouriertransformierte der Beleuchtungsintensität $\widetilde{I}ll u$ über alle drei Raumrichtungen in komplexer Darstellung wird ausgehend von (4.55) berechnet.

$$\begin{aligned} \widetilde{I}ll u(\mathbf{k}) &= \mathcal{F} \left(\sum_i \mathbf{a}_i^2 \right) \\ &+ \mathcal{F} \left(\sum_{i < j} 2 \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} + e^{-i([\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j] \mathbf{r} - \phi_i + \phi_j)} \right) \end{aligned} \quad (4.60)$$

$$\begin{aligned} \widetilde{I}ll u(\mathbf{k}) &= \mathcal{F}(1) \sum_i \mathbf{a}_i^2 + \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j \left[e^{i(\phi_j - \phi_i)} \mathcal{F} \left(e^{i(\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j) \mathbf{r}} \right) \right. \\ &+ \left. e^{i(\phi_i - \phi_j)} \mathcal{F} \left(e^{-i(\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j) \mathbf{r}} \right) \right] \end{aligned} \quad (4.61)$$

$$\begin{aligned} \widetilde{I}ll u(\mathbf{k}) &= \int e^{-i\mathbf{k}\mathbf{r}} d\mathbf{r} \sum_i \mathbf{a}_i^2 + \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j \left[e^{i(\phi_j - \phi_i)} \int e^{i(\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j - \mathbf{k}) \mathbf{r}} d\mathbf{r} \right. \\ &+ \left. e^{i(\phi_i - \phi_j)} \int e^{i(-\mathbf{k}_i + \mathbf{k}_j - \mathbf{k}) \mathbf{r}} d\mathbf{r} \right] \end{aligned} \quad (4.62)$$

$$\begin{aligned} \widetilde{I}ll u(\mathbf{k}) &= 2\pi \delta(\mathbf{k}) \sum_i \mathbf{a}_i^2 \\ &+ 2\pi \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j \left[e^{i(\phi_j - \phi_i)} \delta(\mathbf{k} - \mathbf{k}_i + \mathbf{k}_j) + e^{i(\phi_i - \phi_j)} \delta(\mathbf{k} + \mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j) \right] \end{aligned} \quad (4.63)$$

Die Fouriertransformierte des Beleuchtungsmusters ist eine Summe von Dirac'schen Deltafunktionen. Die vom konstanten Intensitäts-Offset herrührende Deltafunktion befindet sich am Ursprung (an der Nullfrequenz). Die anderen Deltafunktionen liegen jeweils in gegenüberliegenden Zweierpaaren mit den Frequenzen $\mathbf{k} = \mathbf{k}_j - \mathbf{k}_i$ und $\mathbf{k} = \mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j$ vor. Bei der Faltung dieser Summe von δ -Funktionen mit der der fouriertransformierten Fluorophorverteilung $\tilde{\rho}$ entsteht für jeden Summanden eine Kopie von ρ am Ort der jeweiligen δ -Funktion:

$$\tilde{I}_b(\mathbf{k}) = [(\tilde{\rho} * \widetilde{Illu}) \cdot o](\mathbf{k}) \quad (4.64)$$

$$\begin{aligned} \tilde{I}_b(\mathbf{k}) = & 2\pi \left(\tilde{\rho}(\mathbf{k}) * \delta(\mathbf{k}) \sum_i \mathbf{a}_i^2 \right. \\ & + \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j [e^{i(\phi_j - \phi_i)} \tilde{\rho}(\mathbf{k}) * \delta(\mathbf{k} - \mathbf{k}_i + \mathbf{k}_j) \\ & \left. + e^{i(\phi_i - \phi_j)} \tilde{\rho}(\mathbf{k}) * \delta(\mathbf{k} + \mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j)] \right) \cdot o(\mathbf{k}) \end{aligned} \quad (4.65)$$

$$\begin{aligned} \tilde{I}_b(\mathbf{k}) = & 2\pi \left(\tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot o(\mathbf{k}) \sum_i \mathbf{a}_i^2 \right. \\ & + \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j [e^{i(\phi_j - \phi_i)} \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_i + \mathbf{k}_j) \cdot o(\mathbf{k}) \\ & \left. + e^{i(\phi_i - \phi_j)} \tilde{\rho}(\mathbf{k} + \mathbf{k}_i - \mathbf{k}_j) \cdot o(\mathbf{k}) \right] \end{aligned} \quad (4.66)$$

Die im Bildraum vorhandene Intensitätsverteilung lässt sich also als Summe frequenzverschobener Bilder darstellen, denen die selbe (nicht frequenzverschobene) OTF zugrunde liegt:

$$\tilde{I}_b(\mathbf{k}) = \tilde{I}_0(\mathbf{k}) + \sum_{i < j} \tilde{I}_{ij}(\mathbf{k}) + \sum_{i < j} \tilde{I}_{ji}(\mathbf{k}) \quad (4.67)$$

mit dem nicht frequenzverschobenen Bild

$$\tilde{I}_0(\mathbf{k}) = 2\pi \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot o(\mathbf{k}) \sum_i \mathbf{a}_i^2 = A_0 \cdot \tilde{O}_0(\mathbf{k}) \quad (4.68)$$

und den verschobenen Bildern

$$\tilde{I}_{ij}(\mathbf{k}) = 2\pi \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j e^{i(\phi_j - \phi_i)} \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_i + \mathbf{k}_j) \cdot o(\mathbf{k}) = A_{ij} \cdot \tilde{O}_{ij}(\mathbf{k}) . \quad (4.69)$$

Für die komplexen Amplituden A und für die frequenzverschobenen Kopien der Bildfrequenzverteilung \tilde{O} gilt:

$$\begin{aligned} A_0 = 1 = e^{i \cdot 0} , & \quad \tilde{O}_0(\mathbf{k}) = B_0 \cdot \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot o(\mathbf{k}) \\ A_{ij} = e^{i(\phi_j - \phi_i)} , & \quad \tilde{O}_{ij}(\mathbf{k}) = B_{ij} \cdot \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_i + \mathbf{k}_j) \cdot o(\mathbf{k}) \end{aligned} \quad (4.70)$$

mit

$$B_0 = 2\pi \sum_i \mathbf{a}_i^2, \quad B_{ij} = 2\pi \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j \quad (4.71)$$

Es wurde lediglich der von den Phasen ϕ_i und ϕ_j abhängige Anteil A der Amplitude, welcher auf dem komplexen Einheitskreis liegt, von den Kopien separiert. Der realwertige Anteil B der Amplitude wurde in den Bildkopien \tilde{O} belassen

Insgesamt besteht die Intensitätsverteilung in dieser Darstellung aus $(m^2 - m) + 1$ Summanden, deren zugrundeliegende Fluorophorverteilung jeweils frequenzverschoben ist. Die frequenzverschobenen Bildkopien werden für gewöhnlich in Anlehnung an die entsprechenden Ordnungen des fouriertransformierten Beleuchtungsmusters „nullte Ordnung“ für \tilde{O}_0 und „plus erste Ordnung“ \tilde{O}_{kl} , „minus erste Ordnung“ \tilde{O}_{lk} u.s.w. für die frequenzverschobenen Bilder genannt. Das Bild im Ortsraum $I_b(\mathbf{r})$ ist die Rücktransformierte des fouriertransformierten Bildes $\tilde{I}_b(\mathbf{k})$

Im Folgenden wird zur Vereinfachung auf den Doppelindex verzichtet und alle Ordnungen (auch die nullte) werden mit dem Index l von 1 bis n nummeriert.

$$\tilde{I}_b(\mathbf{k}) = \sum_l A_l \cdot \tilde{O}_l(\mathbf{k}), \quad \tilde{O}_l(\mathbf{k}) = B_l \cdot \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_l) \cdot o(\mathbf{k}) \quad (4.72)$$

4.2.1.3 SIM mit mitfahrendem Beleuchtungsmuster

Die dreidimensionale Intensitätsverteilung im Bildraum kann zum Beispiel aufgezeichnet werden, wenn eine Kamera in einer Ebene $z = z_o$ im Bildraum platziert wird. Die Kamera zeichnet dann $I_b(\mathbf{r})|_{z=z_o}$ auf. Wenn nun das Objekt oder die Kamera in z -Richtung verschoben wird, lassen sich beliebige andere z -Ebenen der Intensitätsverteilung aufnehmen. In der Praxis wird jedoch häufig das Objektiv in z -Richtung verfahren, während Bild und Kamera fix bleiben. Hierdurch befindet sich das Beleuchtungsmuster in der z -Richtung immer fix relativ zur aufgezeichneten Ebene. Diese Begebenheit wird hier als mitfahrendes Beleuchtungsmuster bezeichnet. Um für diesen Fall die aufgezeichnete Intensitätsverteilung zu berechnen, ist es sinnvoll, die Beleuchtung in einen in der x - y -Ebene variablen Anteil, und einen multiplikativen, sich in z -Richtung ändernden Anteil zu separieren. Die entsprechenden Wellenvektoren des Gitters \mathbf{k}_i werden in einen auf die x - y -Ebene projizierten Anteil $\mathbf{k}_{x,y,i}$ und den Anteil entlang der z -Achse $\mathbf{k}_{z,i}$ mit $|\mathbf{k}_{z,i}| = k_{z,i}$ zerlegt.

Das Beleuchtungsmuster (4.56) lässt sich unter Verwendung des Additionstheorems des Kosinus umformen:

$$Illu(\mathbf{r}) = \sum_i \mathbf{a}_i^2 + 2 \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j \cos([\mathbf{k}_{x,y,i} - \mathbf{k}_{x,y,j}] \mathbf{r} + [\mathbf{k}_{z,i} - \mathbf{k}_{z,j}] \mathbf{r}_z - \phi_i + \phi_j) \quad (4.73)$$

$$\begin{aligned} Illu(\mathbf{r}) = & \sum_i \mathbf{a}_i^2 + 2 \sum_{i < j} \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j [\cos([\mathbf{k}_{x,y,i} - \mathbf{k}_{x,y,j}] \mathbf{r}_{x,y} - \phi_i + \phi_j) \cdot \cos([\mathbf{k}_{z,i} - \mathbf{k}_{z,j}] \mathbf{r}_z) \\ & - \sin([\mathbf{k}_{x,y,i} - \mathbf{k}_{x,y,j}] \mathbf{r}_{x,y} - \phi_i + \phi_j) \cdot \sin([k_{z,i} - k_{z,j}] z)] \end{aligned} \quad (4.74)$$

Das Muster besteht also aus einer Summe von l Termen, welche wiederum jeweils ein Produkt einer trigonometrischen Funktion $Illu_{x,y,l}(x, y)$, die von x und y abhängt und einer trigonometrischen Funktion $Illu_{z,l}(z)$, die von z abhängt, sind.

$$Illu(\mathbf{r}) = \sum_l Illu_{x,y,l}(x, y) \cdot Illu_{z,l}(z) \quad (4.75)$$

Da bei der Bildaufnahme sich die Beleuchtung in z -Richtung immer mit der Aufnahmeebene verschiebt, sind PSF und Beleuchtung in z -Richtung verschiebungsinvariant. Diese Tatsache kann als Konfokalität bezeichnet werden, da Beleuchtung und Detektion entlang der z -Richtung den selben Fokus haben. In der z -Dimension ergibt sich also der analoge Fall zur Konfokalmikroskopie und $Illu_z$ und h wirken multiplikativ zusammen, während beide faltend auf das Objekt wirken. Diese multiplikative Wirkung durch konfokale Bildgebung ist in Abschnitt 4.1.4.1 unter Verwendung aller drei Raumrichtungen für das Konfokalmikroskop hergeleitet.

Es ergibt sich für das Bild folgender Zusammenhang:

$$I_b(\mathbf{r}) = \sum_l [\rho(\mathbf{r}) \cdot Illu_{x,y,l}(x, y)] * [h(\mathbf{r}) \cdot Illu_{z,l}(z)] \quad (4.76)$$

$$I_b(\mathbf{r}) = \sum_l [\rho(\mathbf{r}) \cdot Illu_{x,y,l}(x, y)] * h_{res,l}(\mathbf{r}) \quad (4.77)$$

Der von z abhängige Anteil der Beleuchtung $Illu_{z,l}$ lässt sich also mit der PSF zu $h_{res,l}$ kombinieren. In dieser Form lässt sich die Bildentstehung analog zum Fall nicht-mitfahrender Beleuchtung berechnen und man erhält für das fouriertransformierte Bild

$$\tilde{I}_b(\mathbf{k}) = \sum_l A_l \cdot \tilde{O}_l(\mathbf{k}) \quad (4.78)$$

mit

$$\tilde{O}_l(\mathbf{k}) = B_l \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_l) \cdot o_{res,l}(\mathbf{k}) . \quad (4.79)$$

Hier ist die resultierende OTF $o_{res,l} = o * \widetilde{Illu}_{z,l}$ abhängig vom Anteil der Beleuchtung in z -Richtung. Dieser Index res,l für die OTF wird auch im Folgenden verwendet, um den Fall des in z -Richtung mitbewegten Beleuchtungsmusters nicht auszuschließen.

4.2.2 Frequenzraumbasierte Bildrekonstruktion

Die konventionelle Bildrekonstruktion bei strukturierter Beleuchtung basiert darauf, die einzelnen Ordnungen zu separieren, ihre Frequenzverschiebung rückgängig zu machen, und sie anschließend wieder zusammensetzen. Für die Separation der Ordnungen müssen zunächst ihre Verschiebungsvektoren \mathbf{k}_l und ihre Amplituden A_l bekannt sein. Die Bestimmung der Verschiebungsvektoren geschieht in der verwendeten Software durch eine Korrelation der überlappenden Frequenzbereiche der einzelnen Ordnungen. Zur Bestimmung der Amplituden benötigt man im Allgemeinen eine Anzahl von Bildern $I_{b,k}$ mit untereinander linear unabhängigen Beleuchtungsmustern, die der Anzahl der Bildkopien $n = (m^2 - m) + 1$ entspricht. Mit der Bezeichnung „linear unabhängige Beleuchtungsmuster“ ist gemeint, dass jedem der vorhandenen Bilder $I_{b,k}$ eine Beleuchtung $Illu_k$ mit einem Vektor von komplexen Amplituden $\mathbf{A}_k = (A_{k,1}, A_{k,2} \dots A_{k,n})$ zugrunde liegt, sodass die Menge der \mathbf{A}_k all dieser Bilder linear unabhängig ist. Ein Verfahren zum Bestimmen der komplexen Amplituden ist in [30] zu finden. Zu bedenken ist, dass der überlappende Bereich eine ausgedehnte Fläche bzw. ein Volumen einer Vielzahl von Messpunkten (Pixeln) ist – das Problem ist also stark überbestimmt – weswegen man in der Lage ist, sowohl \mathbf{A}_k , als auch \mathbf{k}_{ij} zu ermitteln. Wenn alle \mathbf{A}_k bekannt sind, ist es möglich, die einzelnen Ordnungen zu separieren. Es gilt

$$\underbrace{\begin{pmatrix} A_{1,1} & A_{1,2} & \dots & A_{1,n} \\ A_{2,1} & A_{2,2} & \dots & A_{2,n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ A_{o,1} & A_{o,2} & \dots & A_{o,n} \end{pmatrix}}_{\mathbf{A}} \underbrace{\begin{pmatrix} \tilde{O}_1 \\ \tilde{O}_2 \\ \vdots \\ \tilde{O}_n \end{pmatrix}}_{\tilde{\mathbf{O}}} = \underbrace{\begin{pmatrix} \tilde{I}_{b,1} \\ \tilde{I}_{b,2} \\ \vdots \\ \tilde{I}_{b,o} \end{pmatrix}}_{\tilde{\mathbf{I}}} \quad (4.80)$$

und daher im Fall $o = n$

$$\tilde{\mathbf{O}} = \mathbf{A}^{-1} \cdot \mathbf{I} . \quad (4.81)$$

im Fall $o > n$ ist statt der inversen Amplitudenmatrix \mathbf{A}^{-1} die pseudoinverse \mathbf{A}^+ zu bestimmen. Es ist notwendig, dass die Anzahl der vorhandenen Bilder mindestens so groß ist, wie die Ordnungsanzahl, um in der Lage zu sein, die einzelnen Ordnungen zu separieren. Dies gilt auch für den Fall, dass die Amplituden und Verschiebungsvektoren bekannt waren und es somit nicht notwendig war, sie aus den aufgenommenen Bildern

zu ermitteln. Wenn es aufgrund von Symmetrien des Beleuchtungsmusters möglich ist, mehrere Ordnungen zusammenzufassen, die die gleiche Amplitude haben, sinkt die Anzahl der erforderlichen Bilder auf die Anzahl der zusammengefassten Ordnungen. Dies ist bei der Dreistrahlinterferenz der Fall, wo die Anzahl der erforderlichen Bilder von 7 auf 5 reduziert wird. Ähnliches gilt bei der Verwendung eines Beleuchtungsmusters unter verschiedenen Ausrichtungswinkeln. Da hier die nullte Ordnung bei allen Winkeln gleich bleibt, ist nach der Aufnahmesequenz unter dem ersten Winkel für alle folgenden Winkel am gleichen Ort eine Aufnahme weniger anzufertigen. Im Fall der Dreistrahlinterferenz bei drei Winkeln (z.B. 0° , 60° , 120°) sind hierdurch lediglich 13 Bilder erforderlich.

Nach der Trennung der Ordnungen können diese um ihren jeweiligen gespiegelten Verschiebungsvektor $-\mathbf{k}_l$ in Richtung des Ursprungs geschoben werden, um sie anschließend zusammenzufügen und hiermit das fouriertransformierte rekonstruierte Bild $\tilde{I}_{b,recon}(\mathbf{k})$ zu erzeugen. Im Rahmen dieser Kombination wird eine frequenz- und ordnungsabhängige Gewichtung $w_l(\mathbf{r})$ der Bildinformation vorgenommen. Ziel hierbei ist es, eine im Resultat über einen möglichst großen Frequenzbereich konstante Gewichtung der Bildinformation zu erreichen.

$$\tilde{I}_{b,recon}(\mathbf{k}) = \sum_l w_l(\mathbf{k}) \cdot \tilde{O}_l(\mathbf{k} + \mathbf{k}_l) \quad (4.82)$$

Für die verschobenen Ordnungen gilt

$$\tilde{O}_l(\mathbf{k} + \mathbf{k}_l) = B_l \cdot \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot o_{res,l}(\mathbf{k} + \mathbf{k}_l) \quad (4.83)$$

und daher für das rekonstruierte Bild:

$$\tilde{I}_{b,recon}(\mathbf{k}) = \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot \sum_l w_l(\mathbf{k}) \cdot B_l \cdot o_{res,l}(\mathbf{k} + \mathbf{k}_l) \quad (4.84)$$

$$\tilde{I}_{b,recon}(\mathbf{k}) = \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot \sum_l w_l(\mathbf{k}) \cdot o_l(\mathbf{k}) \quad (4.85)$$

$$\tilde{I}_{b,recon}(\mathbf{k}) = \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \cdot o_{recon}(\mathbf{k}) \quad (4.86)$$

\Downarrow

$$I_{b,recon}(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) * h_{recon}(\mathbf{r}) \quad (4.87)$$

Das rekonstruierte Bild lässt sich also als Fluorophorverteilung $\rho(\mathbf{r})$ gefaltet mit einer Rekonstruktions-PSF $h_{recon}(\mathbf{r})$ darstellen, deren Fouriertransformierte o_{recon} eine (ortsabhängige) Linearkombination einzelner frequenzverschobener OTFs o_l ist. Die Gewichtungsfunktionen w_l der einzelnen frequenzverschobenen OTFs sollen nun so gewählt wer-

den, dass in der resultierenden OTF ein möglichst großer Frequenzbereich mit etwa gleicher Stärke in das Bild einfließt. Die resultierende OTF soll also über einen großen Frequenzbereich ungefähr konstant sein.

Hierzu werden die Ordnungen zusammengefügt und im Anschluss Wiener-entfaltet (siehe z.B. [28] und Grundlagen 4.1.7.1).

Die Wiener-Entfaltung basiert unter anderem auf folgenden Annahmen:

- Das Rauschen $n(\mathbf{r})$ ist unabhängig vom Eingangssignal $\rho(\mathbf{r})$
- Das Leistungsdichtespektrum $S(\mathbf{k})$ des Eingangssignals ist bekannt
- Die Impulsantwort $o(\mathbf{k})$ ist bekannt

In der Praxis sind die ersten beiden Annahmen nicht erfüllt: Das Rauschen beinhaltet einen in der Regel überwiegenden Poisson'schen Anteil, der proportional zur Quadratwurzel des Bildsignals und damit proportional zu $\rho(\mathbf{r}) * o(\mathbf{k})$ ist. Da das Eingangssignal unbekannt ist, ist auch sein Leistungsdichtespektrum unbekannt. Aus diesem Grund wird bei der verfügbaren konventionellen Rekonstruktionsmethode für das Objekt ein konstantes Leistungsdichtespektrum angenommen.

Eine detaillierte Beschreibung der konventionellen frequenzraumbasierten Rekonstruktion strukturiert beleuchteter Daten ist in [31] zu finden.

Resultierend aus der Tatsache, dass die vorausgesetzten Annahmen der Wiener-Entfaltung nur unzureichend zutreffen, stellt die Filterung der Ordnungen eine wesentliche Schwierigkeit bei der konventionellen Rekonstruktion strukturiert beleuchteter Daten dar. Es muss bei der verwendeten Software für jede Rekonstruktion der Wiener-Parameter, eine Abschätzung des Verhältnisses von Rauschen zu Signal durch den Anwender vorgegeben werden.

4.2.2.1 2D Rekonstruktion

Die bisher aufgezeigte Bildrekonstruktion trennt die Ordnungen im dreidimensionalen Frequenzraum. Um hierbei eine Separation der Bildinformation in der z -Richtung zu erreichen, ist es notwendig, dass dreidimensionale Bilddaten vorliegen. Ist lediglich ein Bild in einer Ebene verfügbar, liefert diese Methode keine Entfernung des Signals von außerhalb des Fokus. Auch bei zweidimensionalen Daten ist diese z -Separation (*optical sectioning*) allerdings möglich durch eine Frequenzfilterung der Ordnungen. Die OTF überträgt durch ihre toroide Form (siehe Abbildungen 4.2,4.5a) in der Nähe der lateralen Nullfrequenz – also bei kleinen k_x, k_y – auch in der axialen Frequenzdimension k_z lediglich niedrigfrequente Information überträgt (*missing cone*). Durch Ausblenden dieses Frequenzbereiches

und Ersetzten der Information aus den verschobenen OTFs erreicht man hier ein ausge-
dehnteres Spektrum in der axialen Richtung und dadurch eine bessere z -Separation. Diese
Frequenzgewichtung ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

Erstaunlicherweise fiel bei Simulationen (Abschnitt 6.2.1) auf, dass die Rekonstruktion
dreidimensionaler Daten zumindest im Fall von Zweistrahlinterferenz (Abschnitt 4.2.5)
bessere Ergebnisse liefert, wenn sie Ebene für Ebene, also zweidimensional durchgeführt
wird.

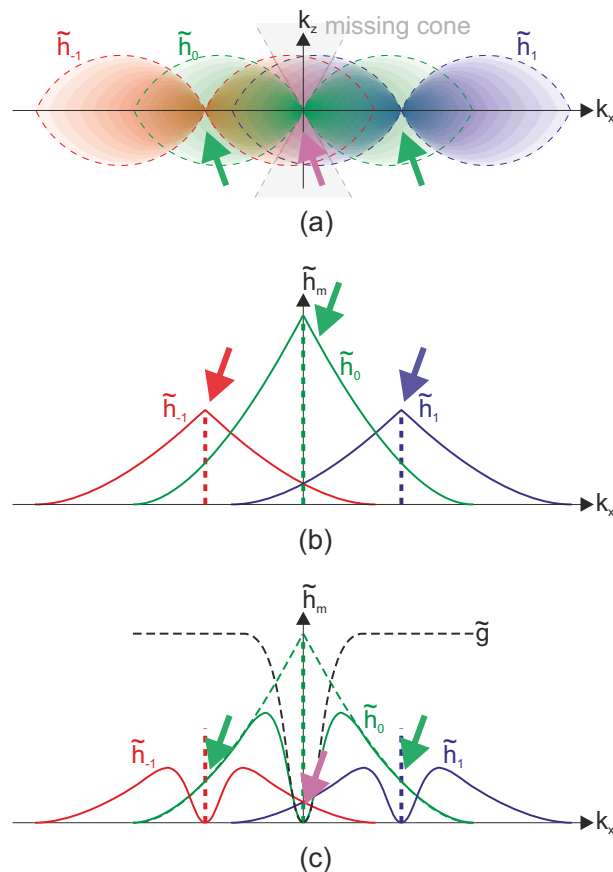


Abbildung 4.9: Rekombination der Ordnungen bei 2D-SIM. Die Ordnungen haben bei niedrigen lateralen
Frequenzen aufgrund des *missing cone* auch axial nur niedrige Frequenzen (a), was gleichbedeutend mit
einer ausschließlichen Übertragung entlang der z -Richtung unbestimmter Information ist. Die Gewich-
tung dieser unbestimmten, also hauptsächlich von außerhalb der Fokusebene stammenden Information
ist zudem verhältnismäßig am stärksten (b). Um dem entgegenzuwirken, werden die entsprechenden
Frequenzen mit einem negativen Gaußfilter entfernt (c) und durch die entsprechenden Frequenzen der
benachbarten Ordnungen ersetzt.

4.2.3 Resultierende Auflösungsverbesserung

Die Auflösung von Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung ist durch die Größe des
übertragenen Frequenzbereichs gegeben, womit sie durch die Größe der Rekonstruktions-
OTF o_{recon} bestimmt ist. Die Ausdehnung von o_{recon} ist wiederum davon abhängig, wie

groß die enthaltenen Gitterwellenvektoren \mathbf{k}_l sind, welche sich wiederum aus den Wellenvektoren der Beleuchtungsstrahlen ergeben. Diese Gitterwellenvektoren unterliegen der Abbe'schen Auflösungsgrenze.

Es gilt

$$\mathbf{k}_l \leq \mathbf{k}_{limit,l} . \quad (4.88)$$

Die Gitterwellenvektoren sind stets maximal so groß, wie der entsprechende parallele Grenzfrequenzvektor $\mathbf{k}_{limit,l}$ (die Grenzwellenvektoren einer OTF sind in Abbildung 4.2 dreidimensional dargestellt). Wird $\mathbf{k}_l = \mathbf{k}_{limit,l}$ angenommen, befindet sich durch die Verschiebung der entsprechenden Ordnung \tilde{O}_l um $-\mathbf{k}_{limit,l}$ im Rekonstruktionsprozess der Ursprung der entsprechenden verschobenen OTF o_l auf der Grenze der Weitfeld-OTF o bei $-\mathbf{k}_{limit,l}$. Der von o_l übertragene längste Wellenvektor $\mathbf{k}_{limit,l}$ parallel zu \mathbf{k}_l ist $-2\mathbf{k}_{limit,l}$. Er hat den Betrag $2k_{limit,l}$ und ist damit doppelt so lang, wie der ursprüngliche Gitterwellenvektor. Mit strukturierter Beleuchtung ist also eine Auflösungsverbesserung um den Faktor 2 möglich.

In der Regel werden für die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung lediglich zwei oder drei interferierende Strahlen verwendet. Diese Konfigurationen und die resultierenden Beleuchtungsmuster sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

4.2.4 Dreistrahlinterferenz

Hier werden drei Strahlen mit den Amplituden a_0 , a_1 und a_{-1} in der Fokusebene zur Interferenz gebracht, die in einer gemeinsamen Ebene parallel zur z -Achse liegen. In der Regel gilt $a_1 = a_{-1}$. Während ein zentraler Strahl parallel zur z -Achse verläuft, sind die anderen beiden Strahlen um θ bzw. $-\theta$ gegen die optische Achse geneigt.

Das Intensitätsmuster (Abbildung 4.10, rechts oben) beinhaltet in der Fourierdarstellung 7, Ordnungen.

Für die Phasenverschiebung bei den verschiedenen Bildern i gilt $\phi_{0,i} = 0$, $\phi_{1,i} = \Phi_i$, $\phi_{-1,i} = -\Phi_i$. Der zentrale Strahl behält also eine konstante Phase (in der Regel 0), während die Phasen der beiden anderen Strahlen antisymmetrisch verschoben werden. Aufgrund dieses Phasenbezuges können jeweils zwei diagonale Ordnungen zusammengefasst werden (dies wird schnell ersichtlich, wenn man die vorgegebenen Phasen und Wellenvektoren in die Gleichung der fouriertransformierten Intensitätsverteilung 4.63 einsetzt), woraus nur noch 5 unabhängige Ordnungen resultieren. Zur Rekonstruktion genügen daher 5 Einzelbilder. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 4.11 verdeutlicht. Die gängige Methode zum Erstellen eines solchen Musters ist das Beugen des Anregungsstrahls an einem Gitter in einer Zwischenbildebene. In der Regel müssen hierzu höhere Beugungsordnungen abgeschirmt werden. Beim Ophthalmoskop mit strukturierter Beleuchtung

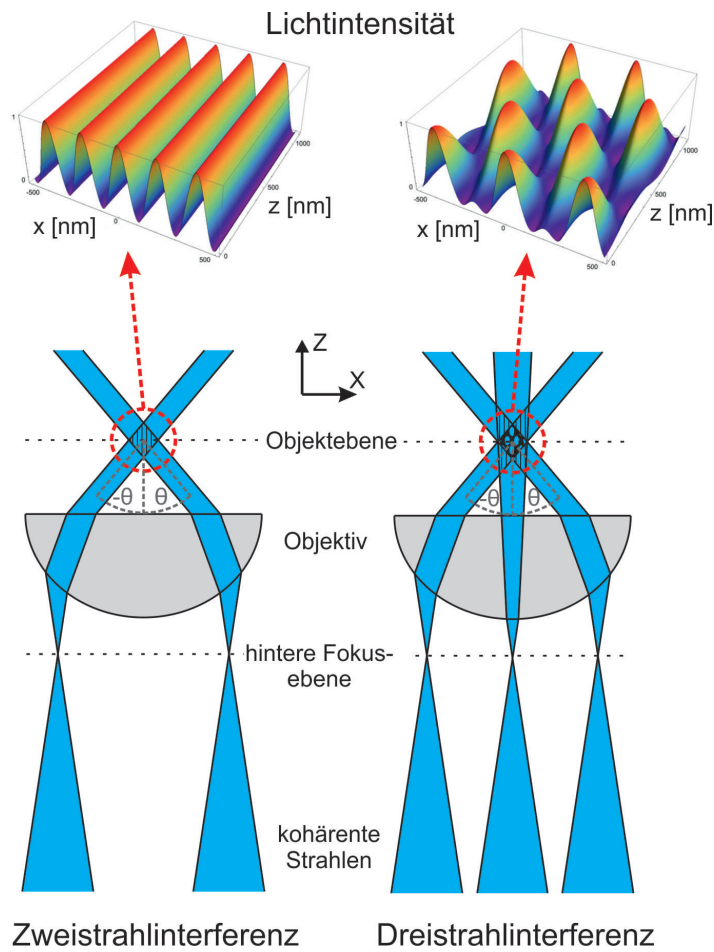


Abbildung 4.10: Im Fall der Dreistrahlint interferenz (linke Seite) besitzt das Interferenzmuster (oben) im Objektraum lediglich eine Modulation entlang einer Richtung in der Fokusebene, es ist also eindimensional. Bei der Dreistrahlint interferenz (rechte Seite) hingegen verfügt das Interferenzmuster zusätzlich eine Modulation entlang der z -Achse. Hierdurch ist Dreistrahlint interferenz in der Lage, auch in axialer Richtung eine Auflösungsverbesserung zu bewirken. Quelle: [24]

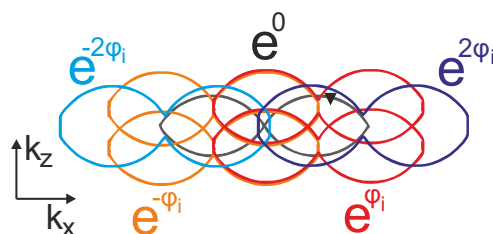


Abbildung 4.11: Resultierende OTF-Ordnungen bei Dreistrahlint interferenz. Der komplexe phasenabhängige Anteil der Intensität ist jeweils dargestellt. Die vier diagonalen Ordnungen können zu zwei zusammengefasst werden, da sie sich mit der Phase kongruent modulieren. Damit kann das Problem von 7 auf 5 zu trennende Ordnungen reduziert werden.

wird Dreistrahlinterferenz verwendet.

4.2.5 Zweistrahlinterferenz

Hier interferieren lediglich zwei Strahlen, die eine Ebene parallel zur z -Achse aufspannen (siehe Abbildung 4.10, linke Seite). Diese Methode erreicht im Gegensatz zur Dreistrahlinterferenz keine Erweiterung des Spektrums in axialer Richtung. Die Auflösung entlang z entspricht nach Abbe also dem Fall der Weitfeldmikroskopie. In der Praxis wird allerdings dennoch die z -Separation durch Auffüllen des *missing cone* der OTF (siehe Abb. 4.9) wesentlich verbessert. Das Kombimikroskop (Abschnitt 4.3) nutzt Zweistrahlinterferenz mithilfe eines Interferometers in einer Zwischenbildebene.

4.2.6 praktische Realisierung

Zur Erzeugung des Beleuchtungsmusters durch die Interferenz kohärenter Strahlen lässt sich entweder ein Interferometer oder ein Beugungsgitter verwenden, wie in Abbildung 4.12 dargestellt. Beide Methoden haben spezifische Eigenschaften und damit individuelle Vor- und Nachteile. Im Fall eines Interferometers ist der Winkel der Strahlen zueinander unabhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts. Hiermit muss für verschiedene Anregungswellenlängen der Gitterabstand nicht angepasst werden. Allerdings lassen sich ausschließlich Laser zur Erzeugung des Musters verwenden, da nur hiermit eine ausreichende Kohärenz vorliegt, um auf der gesamten Objektebene Interferenz zu erhalten. Das Kombimikroskop 4.3, welches für die mikroskopischen Aufnahmen eingesetzt wurde, nutzt einen Interferometeraufbau.

Bei der Verwendung eines Beugungsgitters ergibt sich ein anderes Bild. Das sich in einer Zwischenbildebene befindliche Gitter wird auf die Objektebene abgebildet. Diese Abbildung ist unabhängig von der Wellenlänge. Das Licht in der Fokusebene ist – auch wenn die Lichtquelle inkohärent ist – durch diese Bildgebungsbedingung lokal kohärent. Somit lassen sich sogar Lichtquellen mit breitem Spektrum zur Anregung verwenden. Allerdings muss das verwendete Gitter in der Regel der Wellenlänge angepasst werden, um ein geeignet feines Beleuchtungsmuster in der Probe zu erreichen. Oftmals wird bei SIM-Mikroskopen mit Beugungsgitter kein festes Gitter verwendet, sondern ein *spatial light modulators* (SLM). SLMs bieten die Möglichkeit, ortsabhängig Intensität, Phase oder Polarisierung des Lichts zu variieren. Somit kann mit dem SLM ein beliebiges Muster erzeugt werden, welches sich in die Objektebene abbildet. Das erstellte Ophthalmoskop mit strukturierter Beleuchtung verwendet zur Mustererzeugung einen SLM 5.3.2.5.

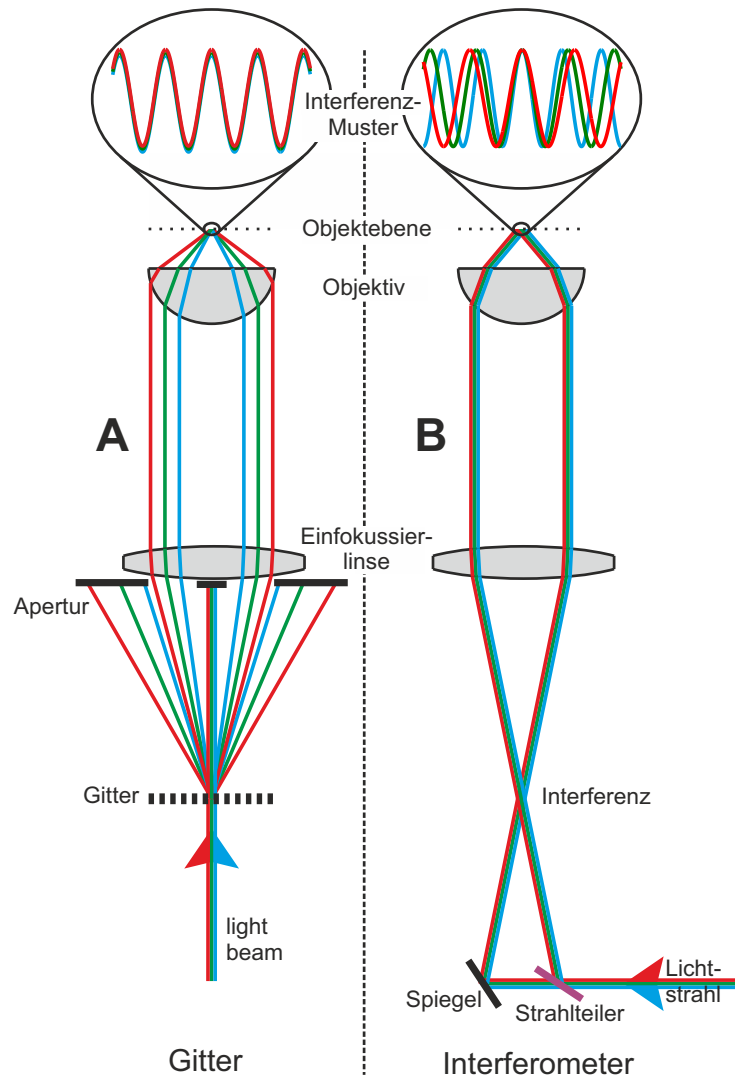


Abbildung 4.12: Der Gitteraufbau (A) liefert einen von der Wellenlänge unabhängigen Gitterabstand. Mit einer solchen Konfiguration lassen sich auch inkohärente Lichtquellen zur Gittererzeugung nutzen. Beim Interferometeraufbau (B) hingegen sind die Winkel der Strahlen unabhängig von der Wellenlänge.

4.3 Das verwendete Mikroskop

Das hochauflösende Mikroskop, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde ist ein selbsterstellter Aufbau, der sowohl SIM, als auch Lokalisationsmikroskopie ermöglicht. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde dieses Mikroskop zur Anwendungsreife entwickelt, während es im Verlauf meiner Doktorarbeit durch mich lediglich in betreuender Funktion weiterentwickelt wurde. Zu Beginn der Arbeit verfügte es nur über einen Anregungsstrahlengang zur Anwendung der strukturierten Beleuchtung, womit unter anderem Gewebeschnitte des retinalen Pigmentepithels untersucht wurden [32, 33, 34]. Eine Beschreibung des ursprünglichen Aufbaus ist in [35] und in meiner Diplomarbeit [2] zu finden. Während der Diplomarbeit wurde, wie in Abbildung 4.13 dargestellt, zusätzlich zu den beiden angewinkelten interferierenden Strahlen ein dritter, zentraler Strahl in das Setup eingebracht, um die Anwendung von Dreistrahlinterferenz (siehe Kapitel 4.2.4) in der Fokusebene zu ermöglichen. Dieser zentrale Strahl wurde allerdings später wieder entfernt, da er aufgrund der aufwändigen Justierarbeit und Schwierigkeiten durch Phasendrifts bei längerandauernden Aufnahmen für allgemeine mikroskopische Untersuchungen nur mit Einschränkungen zu gebrauchen war.

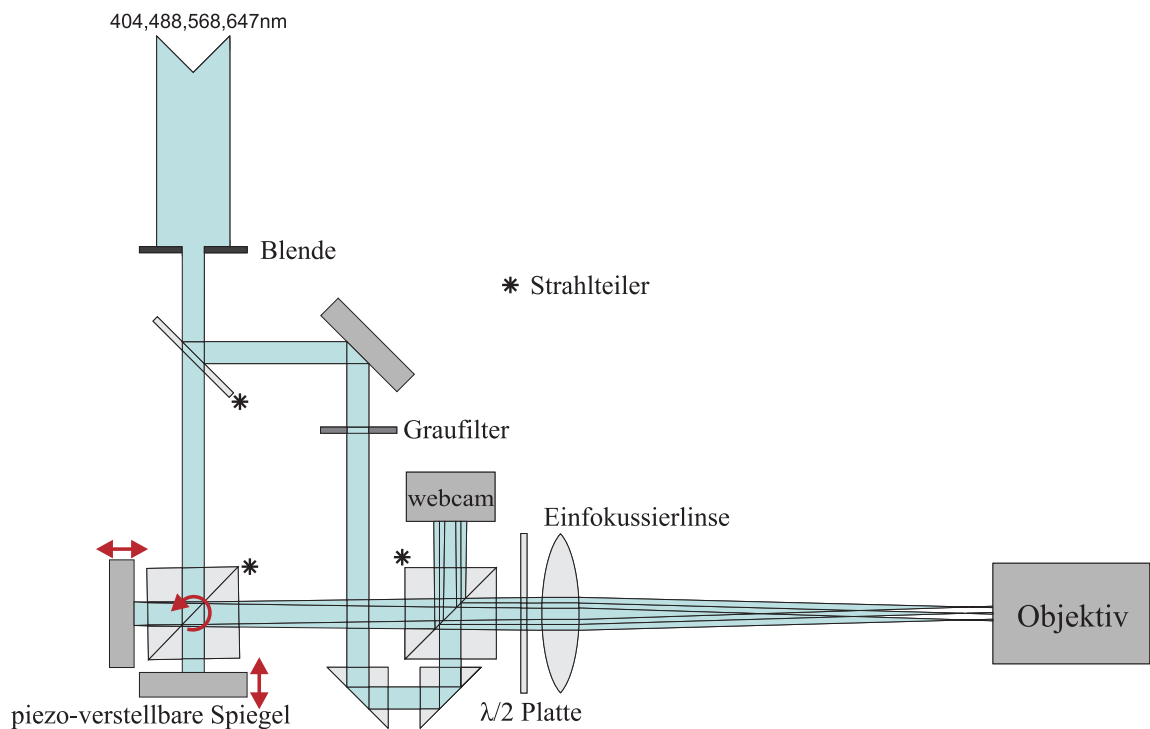


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung des Anregungsstrahlengangs des ursprünglichen Mikroskops. Durch Drehen des Strahlteilerwürfels lässt sich die Wellenlänge des Interferenzmusters einstellen. Durch zwei Piezoaktuatoren an den Spiegeln am Interferometer können die Phasen der Strahlen variiert werden um das Interferenzmuster zu verstellen. Durch eine elektromechanisch rotierbare $\lambda/2$ -Platte wird die Polarisation des Lichts stets so gedreht, dass diese senkrecht auf der von den Strahlen aufgespannten Ebene steht um maximale Interferenz zu erreichen. Quelle: [2]

Eine wesentliche Verbesserung des Aufbaus stellte die Zurverfügungstellung eines op-

tionalen Strahlengangs für Lokalisationsmikroskopie dar. Die erste Realisierung hierzu wurde von Frederik Görlitz während seines Projektpraktikums [36] und anschließend in seiner Bachelorarbeit [37] unter meiner Betreuung durchgeführt. Die Bachelorarbeit ist über die Seite des KIP⁵ erhältlich, der Praktikumsbericht wird auf Anfrage bei mir oder Herrn Prof. Cremer gerne zur Verfügung gestellt. Der Zustand des Mikroskops in *hard-* und *software* zu diesem Zeitpunkt kann als experimentell beschrieben werden. Es waren zum Umschalten zwischen SIM- und Lokalisationsmodus manuelle Vorgänge erforderlich und die Bedienung der Software war im Vergleich zu einem kommerziellen Mikroskop umständlich.

Dies änderte sich, als durch Sabrina Roßberger im Rahmen ihrer Doktorarbeit das Mikroskop grundlegend überarbeitet und dadurch in vielerlei Hinsicht verbessert wurde. Hierzu wurde unter anderem das Mikroskopgestell komplett neu konzipiert. Ebenfalls wurde die Software wesentlich verbessert. Mittels elektromechanisch klappbarer Spiegel lässt sich nun computergesteuert zwischen dem SIM-Modus und der Lokalisationsmikroskopie umschalten. In seiner gegenwärtigen Form verfügt das Mikroskop über Anregungswellenlängen von 404, 488, 568, 671 und 808 *nm* und entsprechende Fluoreszenzfilter, welche vollautomatisch ausgewählt werden können. Ein Schemabild des Aufbaus ist in Abbildung 4.14 zu sehen.

Für eine detaillierte Beschreibung des Gerätes verweise ich auf [38] und die Doktorarbeit von Sabrina Roßberger [39].

⁵Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg

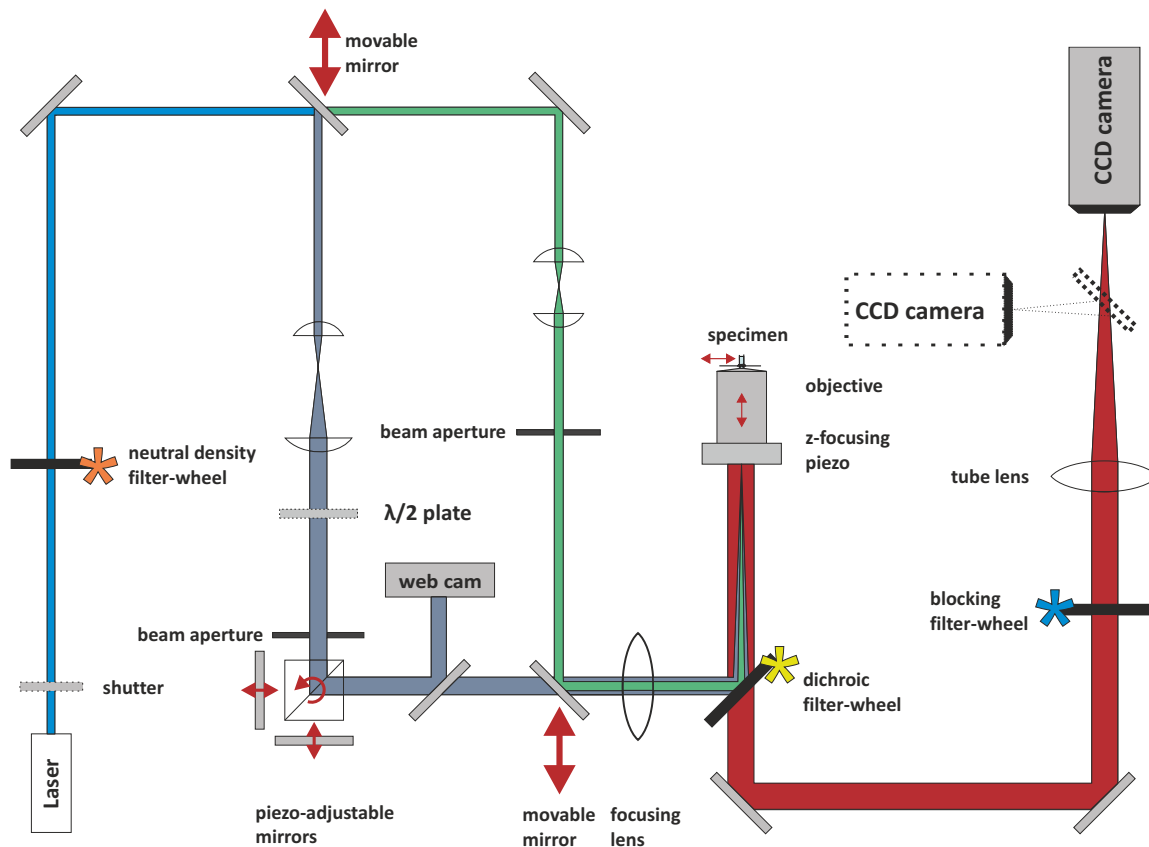


Abbildung 4.14: Schema des kombinatorischen Mikroskops. Das von einem der Laser kommende Licht wird durch ein automatisiertes Graufilterrad (orangener Asterisk) in seiner Lichtleistung angepasst. Ist Spiegel A in den Strahlengang geklappt und Spiegel B geöffnet, durchläuft das Licht den interferometrischen SIM-Strahlengang. Ist die Spiegelanordnung umgekehrt eingestellt, durchläuft der Strahl den Lokalisationsstrahlengang, wo er nur eine leichte Aufweitung erfährt und daher eine für Lokalisationsmikroskopie geeignet hohe Intensität in der Fokusebene aufweist. Der Dichroide, welcher das Licht in Richtung Objektiv lenkt (gelber Asterisk) befindet sich in einem automatisierten Wechsler. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht durchdringt den ebenfalls automatisch einstellbaren Sperrfilter (blauer Asterisk) und wird durch die Tubuslinse auf die Kamera geworfen. Quelle: [38]

4.4 Medizinische Fragestellung

4.4.1 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist eine Gewebeschicht, welche in ihrer Dicke von etwa 15 μm lediglich eine Zelle ausmacht (engl. *cell monolayer*). In der Fläche bedeckt es jedoch fast das gesamte Augenninnere. Es befindet sich zwischen den Photorezeptoren der Netzhaut und der Bruch'schen Membran, welche die Grenzschicht zwischen der Retina und der blutführenden Aderhaut darstellt. Diese Zellschicht wird somit als ein Bestandteil der Retina klassifiziert. Die Zellen des RPE teilen sich in der Regel nicht, weswegen die ihr Alter dem des Gesamtorganismus entspricht.

Das RPE bildet die Blut-Hirn-Schranke zwischen der neuronalen Netzhaut und der Aderhaut. Da eine große Anzahl an Blutgefäßen im Augenninneren das Sehvermögen negativ beeinflussen würde, wird die Netzhaut aus dem Augenninneren nur geringfügig mit durch vereinzelte Blutgefäße mit Nährstoffen versorgt. Ein großer Teil der Versorgung der Netzhaut mit Stoffwechseledukten und -produkten findet durch aktiven Transport dieser durch das RPE statt. Da die Retina das Gewebe mit der höchsten Zelldichte im Körper darstellt, ist hierbei ein reger Stoffaustausch erforderlich. Hauptsächlich müssen durch das RPE Glukose und Sauerstoff zu den Photorezeptoren transportiert und in umgekehrter Richtung metabolisches Wasser und Laktat abgeführt werden. Die Photorezeptoren sind nicht fest mit dem RPE verbunden, sondern werden lediglich durch einen Unterdruck an diesem gehalten. Wird das in der Retina metabolisch erzeugte Wasser insuffizient abgeführt, entsteht ein Abstand zwischen den Photorezeptoren und dem RPE wodurch die Nährstoffversorgung der Netzhaut und somit die visuelle Funktion beeinträchtigt wird. Im schlimmsten Fall kann eine mangelnde Wasserabführung zur Netzhautablösung führen. Die Photorezeptorzellen regenerieren ihre Außensegmente stetig. Hierbei werden die jeweils äußersten Sektionen scheinbarweise abgestoßen. Diese werden vom RPE phagozytiert und abgebaut.

Zusätzlich zur indirekten Aufrechterhaltung der Sehfähigkeit durch das RPE, ist dieses ebenfalls direkt in den Sehprozess eingebunden. Es trägt im Rahmen des für den Sehprozess grundlegenden Retinalzyklus die Aufgabe, Retinal in seine lichtempfindliche Form umzuwandeln. Hierbei wird all-trans-Retinal in das Aldehyd 11-cis-Retinal umgewandelt. Das 11-cis-Retinal wird in die vom RPE in die Außensegmente der Photorezeptoren transportiert, wo die cis-Anordnung durch Absorption eines Photons in eine trans-Anordnung wechselt. Hierdurch wird das Opsin des Rhodopsin aktiviert, welches wiederum eine chemische Kaskade mit abschließender Potentialänderung des Sehrezeptors auslöst.

Eine weitere wichtige Aufgabe des RPE besteht in der Absorption von Licht. Da das RPE als lediglich eine Zelle durchmessende Schicht die Aderhaut vor Photoschädigung schützen

muss, befindet sich eine große Anzahl von Melanosomen im Zytoplasma. Ein weiterer Nutzen der starken Pigmentierung des RPE liegt in der Reduktion von Lichtrückstreuung in die Netzhaut, was den Kontrast verschlechtern würde. Der Sauerstoffgehalt in der Aderhaut ist sehr hoch, sodass in Kombination mit der hohen Lichtenergiedichte eine hohe Erzeugungsrate von Radikalen durch Photooxidation herrscht. Durch die starke Lichtabsorption innerhalb des RPE werden hier besonders viele Radikale generiert, welche mit zahlreichen enzymatischen und nichtenzymatischen Antioxidanzien unschädlich gemacht werden.

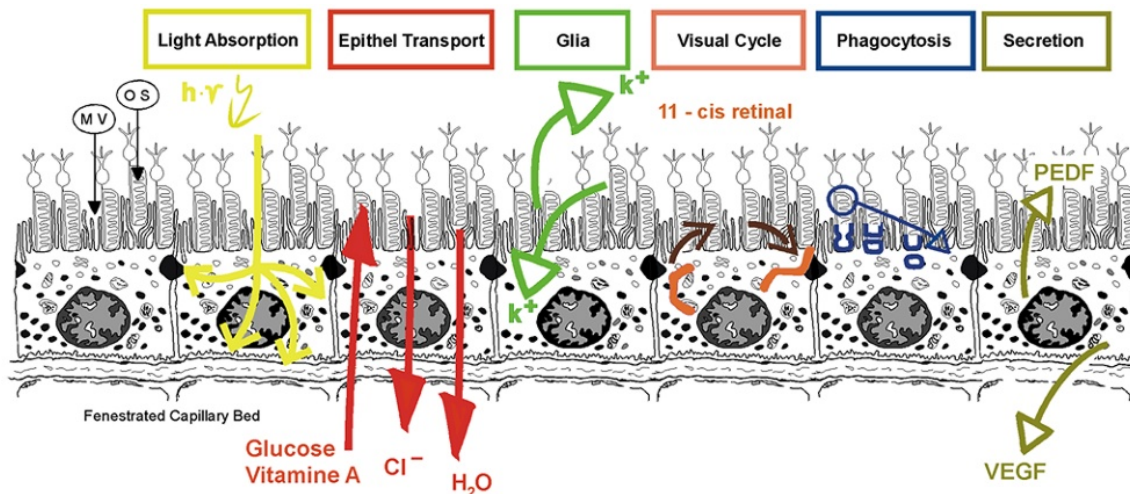


Abbildung 4.15: Darstellung der wichtigsten Funktionen des RPE. Quelle: [40]

4.4.2 Lipofuszin

Als Übersichtsartikel zum Thema Lipofuszin ist ein Artikel von U.T. Brunk und A. Terman aus dem Jahr 2002 gut geeignet [41]. Lipofuszin ist ein Aggregat aus oxidierten Proteinen und Lipiden, welches sich besonders in stark stoffwechselnden Zellen mit zunehmendem Alter des Organismus akkumuliert. Es wird als Altersindikator auf zellulärer Ebene angesehen und in der Medizin häufig mit dem Terminus Alterspigment bezeichnet. Da es sich vermehrt in stark stoffwechselndem Gewebe ablagert, sind davon insbesondere das Gehirn, das Herz und der äußerst stoffwechselaktive Augenhintergrund betroffen. Die massive Ansammlung dieses Aggregats wird mit vielen altersabhängigen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So gehen beispielsweise die neurologischen Erkrankungen Alzheimer [42] und Parkinson [43] mit einer verstärkten Ansammlung von Lipofuszin einher. Die Lipofuszinansammlung innerhalb des RPE im Augenhintergrund scheint eng mit der AMD verknüpft zu sein [44]. Lipofuszin lagert sich in etwa $1\mu m$ großen Klumpen, sogenannten Lipofuszingranula ab. Im allgemeinen entwickeln sich Lipofuszingranula aus lysosomalen *residual bodies*. Diese „verbleibenden Körper“ beinhalten in der Regel nicht von der Zelle abbaubares Material, welches durch die lysosomale Membran vom Zytoplasma abge-

grenzt ist. Normalerweise werden die *residual bodies* von der Zelle ausgeschieden, um ihre Inhaltsstoffe mit dem Zweck ihrer Entfernung aus dem Organismus dem Blutkreislauf zuzuführen. Lipofuszingranula hingegen verweilen dauerhaft im Inneren der Zellen und bestehen aus einem dichten Stoffgemisch aus Proteinen und Lipiden. Da sich das Lipofuszin aus Abfällen des Zellstoffwechsels ergibt, hängt seine Zusammensetzung im Detail von der metabolischen Funktion des betroffenen Gewebes ab. Da das Lipofuszin innerhalb von RPE-Zellen zu einem großen Teil aus unvollständig verdauten Bestandteilen von Photorezeptoraußensegmenten hervorgeht [45], unterscheidet es sich vom Lipofuszin, welches in anderen Organen vorherrscht. Aus diesem Grund weist retinales Lipofuszin eine starke Autofluoreszenz auf, die wesentlich von Fluorophoren stammt, welche sich unter anderem aus Abfallprodukten des Retinolkreislaufs bilden.

Untersuchungen an histologischen Präparaten [44] zeigen, dass die Ansammlung von Lipofuszin mit einer erhöhten Zellsterblichkeit im RPE und der benachbarten Retina einhergeht. Die Bestimmung der zugrundeliegenden Kausalität gestaltet sich jedoch schwierig, da *ex vivo* Zellkulturexperimente das komplexe Wechselspiel zwischen RPE, Retina und Choridia nur sehr vereinfacht wiedergeben können. Mit dem Ziel der besseren Erforschung der verschiedenen Verlaufsformen der altersbedingten Makuladegeneration wurden in den letzten Jahren verstärkt unterschiedliche, von der Maus bis zum Affen reichende, Tiermodelle entwickelt [46]. Jedoch ist auch hiermit der Einfluss der Lipofuszingranula nicht separat analysierbar, da eine verstärkte Lipofuszinakkumulation nicht ohne zugrundeliegende weiterreichende metabolische Dysfunktionen ausgelöst werden kann.

Es gibt mehrere Mechanismen, durch welche sich Lipofuszin schädigend auf RPE-Zellen und ihre Funktionalität auswirken können. Zum einen können die Lipofuszingranula durch ihre schiere Anzahl und das damit einhergehende Einnehmen eines beträchtlichen Anteils des Zellvolumens die Funktion der Zelle negativ beeinflussen, zum anderen gibt es verschiedene biochemische Prozesse, durch welche Lipofuszin in der Lage sind, die Zellen zu schädigen. Der tatsächliche Einfluss der verschiedenen Schädigungsmechanismen auf das menschliche Auge und die verschiedenen Verlaufsformen der AMD konnte allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden. Es konnte daher bis zum heutigen Stand noch nicht klar bewiesen werden, dass das Lipofuszin die AMD maßgeblich befeuert, oder ob es sich bei der Lipofuszinakkumulation lediglich um ein eher harmloses Symptom der zur Erkrankung führenden grundlegenden Mechanismen handelt. Allerdings ist es mittlerweile aufgrund der Indizien anerkannt, dass das Lipofuszin eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der AMD spielt.

Die Lehrmeinung besagt zwar, dass die Ansammlung von Lipofuszin beim Menschen irreversibel ist, vor kurzem [47] wurde jedoch an Affen gezeigt, dass es möglich ist, medikamentös eine Ausscheidung von Lipofuszingranula aus den RPE-Zellen zu erreichen. Ob hierdurch der Verlauf der AMD positiv beeinflusst werden kann, ist zum heutigen

Stand noch nicht beschrieben. Auch wenn die Bedeutung von Lipofuszin für die Entwicklung der AMD noch nicht vollständig geklärt ist, ist die durch Lipofuszin ausgelöste Fundusfluoreszenz ein wichtiger Indikator für die Entwicklung der Erkrankung.

Retinales Lipofuszin weist eine starke, äußerst breitbandige Autofluoreszenz auf, welche sich aus der Kombination einer Vielzahl verschiedener Fluorophore ergibt. Das Emissionsspektrum bei Anregung mit einer Wellenlänge von 400 nm hat eine Halbwertsbreite von über 200 nm [48] (*ex vivo* Untersuchung extrahierter LF-Granula). Das Spektrum ist dabei nicht stark von der Anregungswellenlänge abhängig. Für verschiedene Anregungswellenlängen zwischen 400 und 532 nm liegt das Maximum des Emissionsspektrums jeweils ungefähr bei 600 nm (Abb. 4.16), was bei einer Anregung im nahen UV-Bereich (400 nm) eine große Stokes-Verschiebung von 200 nm und eine entsprechend hohe Energiedeposition von etwa 1 eV pro Photon ergibt. Eine Untersuchung der Polarisierung des von Lipofuszin emittierten Lichts bei (linear) polarisierter Anregung [48] zeigt, dass die Polarisierung in Abhängigkeit vom Wellenlängendelta abnimmt sodass das Licht im Bereich des Emissionsmaximums praktisch unpolarisiert ist. Dies weist darauf hin, dass die Emitter im orangenen Spektralbereich (z.B. A2E) im Wesentlichen durch Energietransfers angeregt werden.

Das Emissionsspektrum von Lipofuszin variiert zwischen einzelnen Granula und ist zudem von weiteren Faktoren, wie dem Alter des Organismus und der untersuchten Region innerhalb des Auges abhängig. Zusätzlich gibt es starke Verschiebungen des Spektrums, wenn das Lipofuszin beispielsweise in Paraffin fixiert wird (blauverschoben). Hiermit lässt sich erklären, weswegen sich die in der Literatur zu findenden Spektren oft leicht unterscheiden.

Für die Konzeption des Ophthalmoskops mit strukturierter Beleuchtung war es daher notwendig, das Anregungs- und Emissionsspektrum von Lipofuszin *in vivo* möglichst genau zu kennen. Von großer Bedeutung für die Recherche war eine Arbeit von Delori et al. [49], welche sich mit den spektralen Eigenschaften der Fundusautofluoreszenz beschäftigt. Zur Messung des Anregungs- und Emissionsspektrums wurde ein ophthalmisches Spektrometer mit verschiedenen möglichen Anregungswellenlängen zwischen 430 und 550 nm entwickelt [50] und in einer klinischen Studie angewandt. Die erhaltenen Spektren sind in Abb. 4.17 wiedergegeben. Da es sich hierbei um *in vivo* Messwerte des aus der Pupille austretenden Lichts handelt, sind die Einflüsse der Absorption und Streuung sowohl des Anregungslichts, als auch des Fluoreszenzlichts bereits inbegriffen. Gemittelt über alle Probanden zeigte sich ein Maximum des detektierten Fluoreszenzlichts zwischen 510 und 550 nm . In der Publikation sind die Spektren nicht relativ (*i.e.* normiert), sondern in absoluten Werten angegeben, was es möglich machte, die zu erwartende Signalstärke auf der Kamera des Ophthalmoskops abzuschätzen.

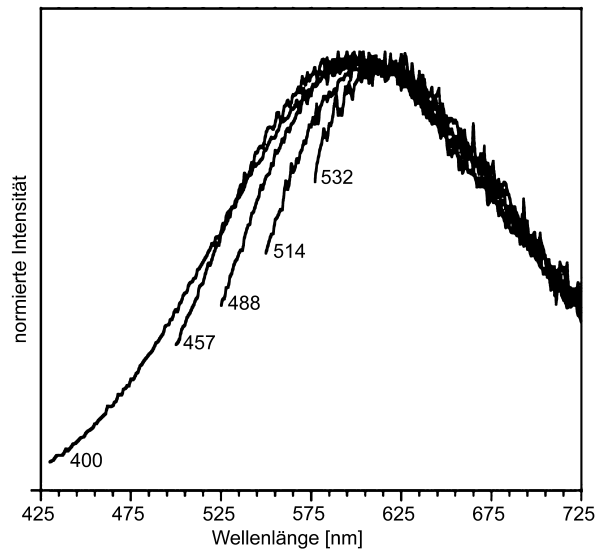


Abbildung 4.16: Normiertes Emissionsspektrum auf Glas aufgebracht Lipofuszingranula bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Die Spektren sind jeweils mit ihrer Anregung gekennzeichnet. Quelle: [48]

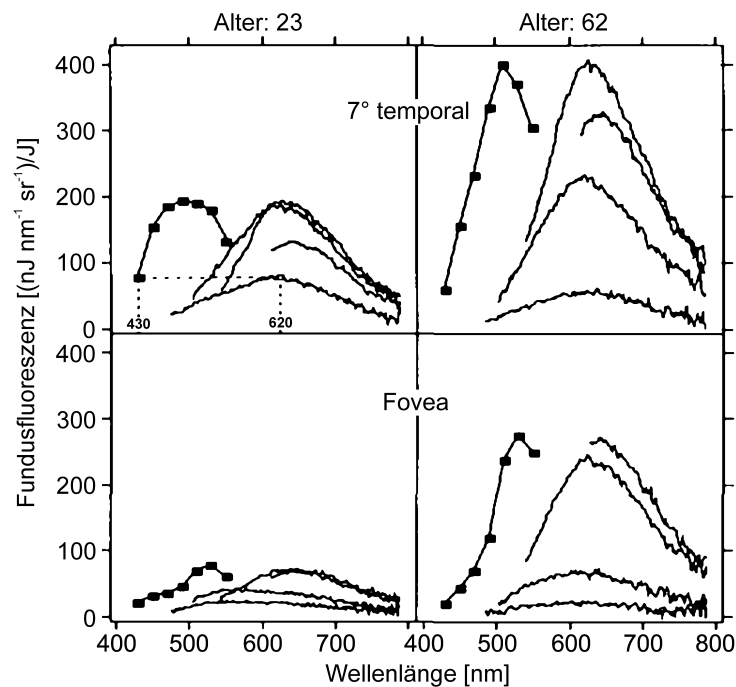


Abbildung 4.17: Fluoreszenzspektren des Augenhintergrundes in der Fovea (zentrale Makula) (unten) und 7° von der Makula entfernt (oben) eines 23-jährigen (links) und eines 62-jährigen (rechts) Probanden. Die kontinuierlichen Spektren stellen die Emission bei 430, 470, 510 und 550 nm Anregungswellenlänge dar. Die einzelnen Spektren können jeweils anhand ihrer Startwellenlänge identifiziert werden (die langwelligen Spektren haben einen langwelligeren Startpunkt). Die diskreten, mit Linien verbundenen Kurven geben das Anregungsspektrum wieder bei einer detektierten Wellenlänge von 620 nm. Im oberen linken Teilbild wird der Zusammenhang zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum für die Anregung mit 430 nm verdeutlicht (gestrichelte Linien). Quelle: [49]

4.4.3 Die altersbedingte Makuladegeneration

Der Krankheitsbegriff der altersbedingten Makuladegeneration bezeichnet den schleichen- den Prozess des Verlustes der Sehfunktion in der Makula, dem zentralen Sichtfeldbereich, in welchem die Sehfähigkeit für gewöhnlich am schärfsten ist. In der Makula ist der Anteil der Sehzapfen an den Photorezeptoren, welche für die Farbwahrnehmung verantwortlich sind, am höchsten. Außerhalb der Makula kann Farbe nur sehr schlecht wahrgenommen werden, auch wenn dies einem Menschen mit guter Sehfunktion nicht auffällt, da das wahrgenommene Bild mit Informationen aus der Erinnerung und mithilfe der im periphe- ren Bereich sehr vereinzelt vorhandenen Sehzapfen ergänzt wird. In der Makula ist die Flächendichte der Nervenverbindungen, welche durch den Sehnerv die Bildinformation in das Gehirn leiten sehr viel höher, als im peripheren Bereich. In der Peripherie wird die Bildinformation durch die Netzhaut zum Teil in Bewegungsinformation umgewandelt und in dieser Form komprimiert weitergeleitet. Eine tatsächliche Auflösung feiner Struk- turen mit der Peripherie ist daher nicht möglich, obwohl die Dichte der dort vorhandenen Photorezeptoren uns hierzu prinzipiell befähigen würde.

Menschen, die von der AMD betroffen sind, verlieren daher nach und nach die Fähigkeit zu lesen und Gesichter zu erkennen, woraus ein Verlust von Selbstständigkeit und Le- bensqualität entsteht. Dies ist für die Betroffenen umso schwerwiegender, da sich die Erkrankung im Alter manifestiert. Die Betroffenen sind ein Leben mit guter Sehfunktion gewohnt und können den Sehverlust nur schlecht kompensieren, wozu in jungen Jahren erblindete in bemerkenswerter Weise durch eine bessere Nutzung der verbleibenden Sinne in der Lage sind.

Die AMD stellt in der westlichen Welt die häufigsten Grund für Blindheit bei Men- schen über dem fünfzigsten Lebensjahr dar [51]. In Deutschland ist sie auf die Gesamt- bevölkerung betrachtet die mit Abstand die häufigste Ursache für Neuerblindungen [52]. Aufgrund der demografischen Entwicklung ist ein starker Anstieg der Bedeutung der AMD zu erwarten.

Zu Beginn der Erkrankung steht eine Fehlfunktion des retinalen Pigmentepithels, welche in der Regel mit vermehrter Ansammlung von Lipofuszin im Inneren der RPE-Zellen ein- hergeht. Im weiteren Verlauf wird im Wesentlichen zwischen zwei Formen unterschieden:

4.4.3.1 Trockene AMD

Im Verlauf der trockenen AMD, welche den Großteil der Erkrankungen umfasst, bilden sich zwischen dem RPE und der Bruch'schen Membran domartige Ablagerungen – soge- nannte Drusen –, welche in ihrer Größe stark variieren können (von wenigen Mikrometern bis Millimetern). Hierbei gibt es wiederum eine Unterscheidung zwischen dichten (harten) und löchrigen (weichen) Drusen. Die Drusen scheinen einen ähnlichen metabolischen Ur-

sprung aufzuweisen wie des Lipofuszin innerhalb der RPE-Zellen. Drusen weisen ebenfalls eine Autofluoreszenz auf, welche allerdings schwächer, als die des Lipofuszin ist. Zudem befinden sich innerhalb sowohl weicher, als auch harter Drusen vereinzelt Lipofuszingranula [34]. Die sich bildenden Drusen stellen eine Barriere zwischen dem RPE und der Retina auf der einen und der Bruch'schen Membran und der Aderhaut auf der anderen Seite dar. Hierdurch können RPE und Netzhaut nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden. In der Folge sterben die RPE-Zellen und die Sehzellrezeptorzellen in den betroffenen Regionen in großer Zahl ab und es kann zur lokalen Netzhautablösungen (Netzhautforamina) kommen. Wenn die RPE-Zelldichte so weit reduziert ist, dass nicht mehr zu schließende Löcher im RPE entstehen, spricht man von geographischer Atrophie. Es existiert gegenwärtig keine wirksame Behandlungsmöglichkeit der trockenen AMD.

4.4.3.2 Feuchte AMD

Die feuchte AMD beschreibt einen Krankheitsverlauf, in welchem Blutgefäße Bruch'sche Membran und RPE durchstoßen und in die Netzhaut vordringen. Die wuchernden Blutgefäße neigen zu Blutungen, welche großflächige Seheinschränkungen bewirken und damit innerhalb kurzer Zeiträume zur Erblindung führen können. Das Wachstum der Blutgefäße ins Augeninnere wird durch vermehrte Ausschüttung des Signalmoleküls VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) in der Netzhaut hervorgerufen, was wiederum eine Nährstoffunterversorgung des entsprechenden Gewebes zur Ursache hat. VEGF dient im Körper dazu, die Angiogenese, also das Blutgefäßwachstum zu steuern. Bestimmte Tumorarten verwenden VEGF, um eine bevorzugte Blutversorgung des Tumors hervorzurufen. Aus diesem Grund werden VEGF-Antikörper in der Krebstherapie eingesetzt, um das Signalmolekül zu binden und damit das Tumorgewebe zu stoppen und das Tumorgewebe durch die hervorgerufene Blutunterversorgung abzutöten. Zu diesem Zweck wird dieses Chemotherapeutikum (Avastin[®]) in großer Menge in den Blutkreislauf eingebracht.

Die angiogenesehemmende Wirkung von Avastin wurde und wird allerdings auch zur Behandlung der feuchten AMD eingesetzt. Hierzu wird mittels einer Spritze eine geringe Menge Avastin in der Augenhintergrund eingebracht, wo es für mehrere Wochen die Blutgefäßwucherung unterbindet. Die Anwendung von Avastin zur Behandlung der feuchten AMD wurde jedoch nicht zugelassen, da der Hersteller Roche (Basel, Schweiz) diese nie beantragt hatte. Aufgrund der geringen Darreichungsmenge bestand hieran kein wirtschaftliches Interesse. Stattdessen kam, als sich die Avastin-Behandlung der feuchten AMD zu etablieren begann, ein anderer VEGF-Hemmer mit dem Namen Lucentis[®] vom 33%-igen Roche-Eigner Novartis (Basel, Schweiz) mit einem Preis von 1200 Euro pro Behandlungseinheit auf den Markt, welcher speziell für die Behandlung der feuchten AMD zugelassen wurde. Klinische Studien ergaben keinen signifikanten Unterschied der beiden Behandlungsmöglichkeiten in Hinblick auf Wirksamkeit und Nebenwirkungen. Mit

der Anwendung von Avastin, obwohl ein zugelassenes Pendant existiert, begibt sich der behandelnde Arzt jedoch juristisch in Gefahr. Vor kurzem wurde gegen die beiden Unternehmen durch das italienische Kartellamt wegen Absprachen in diesem Sachverhalt eine Strafe von 180 Millionen Euro verhängt. Neuerdings gibt es mit dem Medikament Eylea[®] eine weitere VEGF-hemmende hochpreisige Behandlungsalternative.

4.4.4 Bildgebungsmethoden zur Darstellung des Augenhintergrundes

Erkrankungen des Augenhintergrundes, insbesondere die altersbedingte Makuladegeneration 4.4.3, gehen häufig mit mikroskopischen physiologischen Veränderungen im Gewebe einher. Das Auge hat durch seine Funktion als biologischer Bilddetektor die außergewöhnliche Eigenschaft, dass es für elektromagnetische Wellen im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts (etwa 400 bis 700 *nm*) und im nahen infraroten Bereich bis etwa 1100 *nm* durchlässig ist. Hierbei ist zu beachten, dass die Transparenz des Augapfels für sichtbares Licht nur durch den inversen Aufbau des hinteren Augenabschnitts ermöglicht ist (siehe Abschnitt 4.4.5).

Um unter Verwendung von Licht eine Darstellung des Augenhintergrundes mit hoher Auflösung zu ermöglichen, steht eine Reihe von etablierten Techniken zur Verfügung:

- **Otische Kohärenztomographie OCT**
Eine auf der Interferenz von Licht einer geringen Kohärenzlänge basierende Bildgebungsmethode für streuende Materialien. Hierbei wird die Interferenz von rückgestreutem Licht mit dem Licht aus einem Referenzarm eines Interferometers untersucht. Dadurch lässt sich die Entfernung der rückstreuenden Gewebeschicht mit großer Genauigkeit messen. OCT-Geräte können sowohl rasternd, als auch weitfeldbildgebend realisiert werden. Ophthalmische OCT sind in der Regel rasternd.
- **Funduskamera**
Gerät für Weitfeld-Reflexionsbildgebung (Fundusfotografie) des Auges. Das Auge wird hierbei gewöhnlich mit weißem Licht beleuchtet und das reflektierte Licht wird auf einen Bilddetektor gelenkt. Es kann allerdings auch schmalbandiges Licht zur Anregung von Fluoreszenz verwendet werden, welche dann bildgebend detektiert wird. In der Regel werden Funduskameras für großflächige Übersichtsaufnahmen verwendet.
- **Scanning-Laser-Ophthalmoskope (SLO)**
Diese Geräte stellen eine Klasse von punktwise rasternden Instrumenten dar. Sie werden sowohl zur Reflexions- als auch zur Fluoreszenzbildgebung verwendet. Sie sind als Anwendung der konfokalen Mikroskopie (siehe Grundlagen 4.1.4.1) am Auge

zu sehen. Diese Geräte stellen das Mittel der Wahl dar, um die im Rahmen der AMD auftretenden Autofluoreszenzen aufzuzeichnen. Wie in Abbildung die Auflösung 4.18 dargestellt, ist es mit den hiermit aufgenommenen Bildern möglich, die zugrundeliegenden Änderungen des Augenhintergrundes wesentlich besser zu erkennen, als dies bei einer Fundusfotografie der Fall ist. Die laterale Auflösung der Scanning Laser Ophthalmoskopie liegt in der Praxis bei etwa $50 \mu m$.

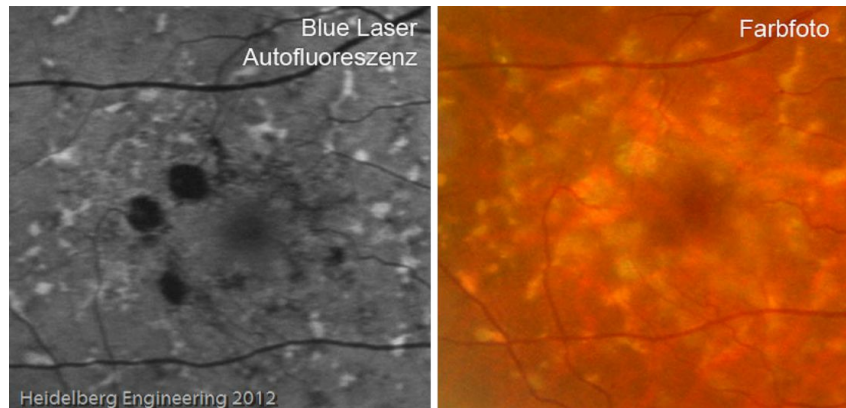


Abbildung 4.18: Scanning Laser Ophthalmoskopie (links) im Vergleich zur Fundusfotografie (rechts). Zu sehen ist der Augenhintergrund eines Patienten mit Morbus Stargardt, einer juvenilen Makuladegeneration. Quelle: Heidelberg Engineering [53]

Außer diesen im klinischen Alltag etablierten Methoden gibt es neue Entwicklungen, die in der Lage sind, eine erhöhte Auflösung bereitzustellen:

- **Zwei-Photonen-Ophthalmoskopie**
Dies ist die Anwendung der mehr-Photonen-Mikroskopie (siehe Grundlagen 4.1.4.4) am Auge. Eine Schwierigkeit hierbei stellt die hohe erforderliche Lichtintensität des von einem gepulsten Laser stammenden Lichts dar. Daher werden durch die Methode die gegebenen Grenzwerte überschritten, weswegen die Technik lediglich in Tierversuchen ([54]) angewandt wurde.
- **Ophthalmoskopie mit adaptiver Optik**
Hierbei werden mittels adaptiver Optik die Brechungsfehler (Aberrationen, siehe 4.4.5.3) des Auges korrigiert. Hierdurch ist es möglich, die Brechungsfehler näherungsweise vollständig zu korrigieren sodass der Augenhintergrund praktisch beugungsbegrenzt aufgezeichnet werden kann. Bei der Anwendung von adaptiver Optik in Kombination mit SLO konnte im Vergleich zur konventionellen SLO eine enorme Bildverbesserung realisiert werden (siehe Abbildung 4.19). Derartige Geräte sind allerdings nach meinem Kenntnisstand noch nicht kommerziell erhältlich.

Die Veränderungen im Augenhintergrund auf mikroskopischer Skala (z.B. frühe Drusen) können mit konventionellen Geräten nicht aufgelöst werden. Scanning-Geräte mit adaptiver Optik wären dazu theoretisch in der Lage, da die Auflösung im Auge nicht durch die

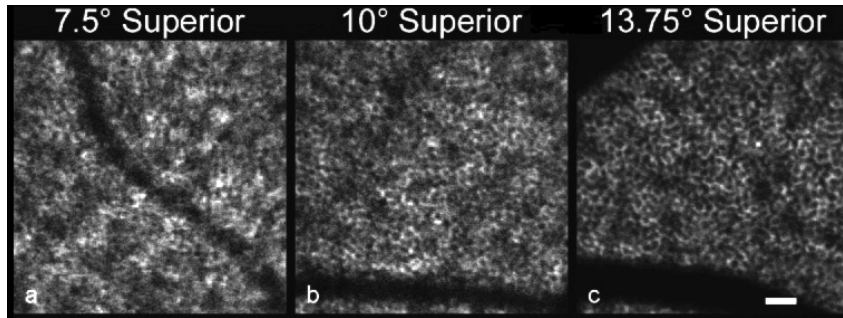


Abbildung 4.19: Scanning Laser Ophthalmoskopie mit adaptiver Optik. Es sind Autofluoreszenzverteilungen unterschiedlich weit von der zentralen Makula entfernter Bereiche dargestellt. Es sind einzelne hexagonal angeordnete Zellen zu erkennen. Quelle: [54]

Beugung, sondern im Wesentlichen durch die Brechungsfehler limitiert ist, was im folgenden Abschnitt erläutert wird. Im Klinikalltag stehen solche Geräte nicht zur Verfügung, da sie noch nicht kommerziell verfügbar sind. Die Verwendung Adaptiver Optik erhöht darüber hinaus die Komplexität des Gerätes. Als adaptives Element wird hierzu ein deformierbarer Spiegel verwendet, da lediglich derartige Spiegel einen genügend großen Verfahrensweg bieten um die Linsenfehler des Auges zu korrigieren.

4.4.5 Das menschliche Auge als optisches System

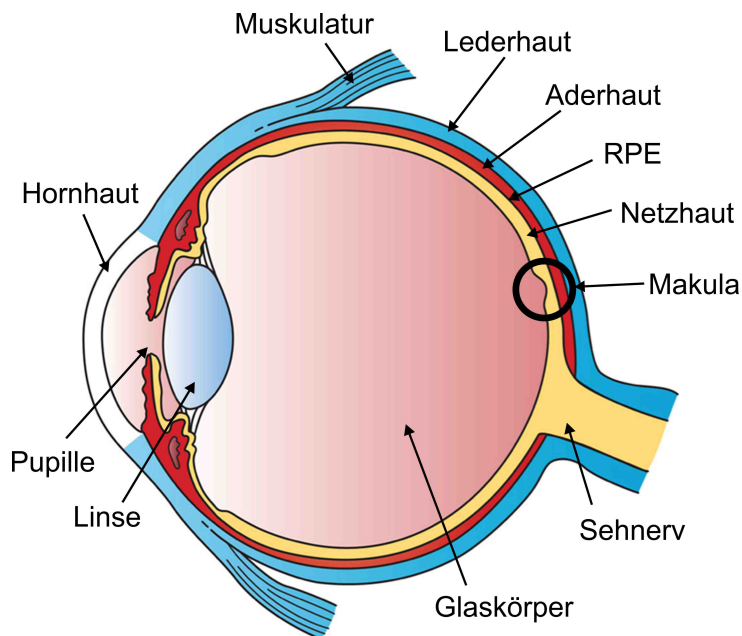


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung des menschlichen Auges

Das menschliche Auge hat einen Durchmesser von etwa 22 mm und kann näherungsweise als optisches System aufgefasst werden, welches ein in der Unendlichkeit liegendes Objekt auf den Augenhintergrund abbildet. Maßgeblich für die dafür notwendige Lichtbrechung ist der Durchgang des Lichts in die Hornhaut und durch die Augenlinse. Die Augenlinse ist

elastisch und deren Brennweite kann durch die Linse streckende Muskeln an deren Rand in geringem Maß verändert werden um den Fokus des Auges zu korrigieren. Diese Fähigkeit zur Fokuskorrektur (Akkommodation) geht jedoch mit steigendem Alter verloren, was zur Altersweitsichtigkeit führt. Das menschliche Auge ist so aufgebaut, dass das Licht, bevor es durch die Sehrezeptoren detektiert werden kann, die Netzhaut durchdringen muss. Die Sehrezeptoren bilden damit also die letzte Schicht der Netzhaut. Aus diesem Grund ist die Netzhaut weitgehend transparent und es befinden sich nur vereinzelte Blutgefäße in bzw. über der Netzhaut. Die Bildinformation, welche nach der Auslösung innerhalb der an das RPE grenzenden Lichtrezeptoren zunächst durch die retinalen Neuronen weiterverarbeitet und dabei gewissermaßen komprimiert wird, muss vom Inneren des Auges in den visuellen Cortex des Gehirns gelangen. Dies geschieht über den etwa 3 mm dicken Sehnerv, welcher den Rand des Augapfels durchdringt.

Der Anteil des Lichts, der Hornhaut, Pupille, Augenlinse, Glaskörper und Netzhaut ungehindert passiert hat, gelangt in die Sehrezeptoren, die das Licht detektieren. Die stäbchenförmigen Sehrezeptoren (sowohl Sehzapfen, als auch Sehtäbchen) fungieren als Lichtleiter [55], [56]. Ihre Transmittivität ist damit vom Eindringwinkel des Lichts abhängig. Die Rezeptoren besitzen eine Orientierung in Richtung der Pupille, woraus eine bevorzugte Wahrnehmung von direktem, ungestreutem Licht und damit eine Erhöhung des Bildkontrastes resultiert.

4.4.5.1 Absorption, Streuung und Autofluoreszenz

Das Auge ist im Wellenlängenbereich zwischen etwa 400 nm und 1200 nm Lichtdurchlässig. Abbildung 4.21 stellt den Anteil des direkten Lichts in Abhängigkeit der Wellenlänge dar, der auf den unterschiedlichen Gewebeschichten noch ankommt, also weder gestreut, noch absorbiert wurde. Auf der Retina kommt nur etwa die Hälfte des direkten Strahls an. In Abbildung 4.21 ist nicht der Anteil des Lichts dargestellt, der letztendlich auch die Retina durchdringt. Ein weiterer lichtabsorbierender Faktor in der Retina ist hierbei das Makulapigment. Dieses befindet sich in den augeninnersten Netzhautschichten im Bereich der Makula und absorbiert ultraviolettes und blaues Licht [57]. Das Absorptionsspektrum liegt zwischen 390 und 540 nm, hat ein Maximum bei 460 nm und absorbiert etwa 40% dieses blauen Lichts.

Bei älteren Personen kann zusätzlich zur Streuung des Lichts bei gesunden Augen, wie sie in das abgebildete Transmissionsspektrum (4.21) einfließt, zusätzlich durch die Entstehung von Katarakt (grauem Star) eine starke Streuung von Licht durch die Augenlinse auftreten. Bei der Bildgebung der Autofluoreszenzverteilung des Augenhintergrundes betrifft diese Streuung sowohl das Anregungslicht, welches ins Auge eingestrahlt wird als auch das Emissionslicht, welches aus dem Auge austritt. Das Maximum des beim Eindringen gestreuten Lichts liegt in Richtung des ungestreuten Lichts (Mie Streuung an

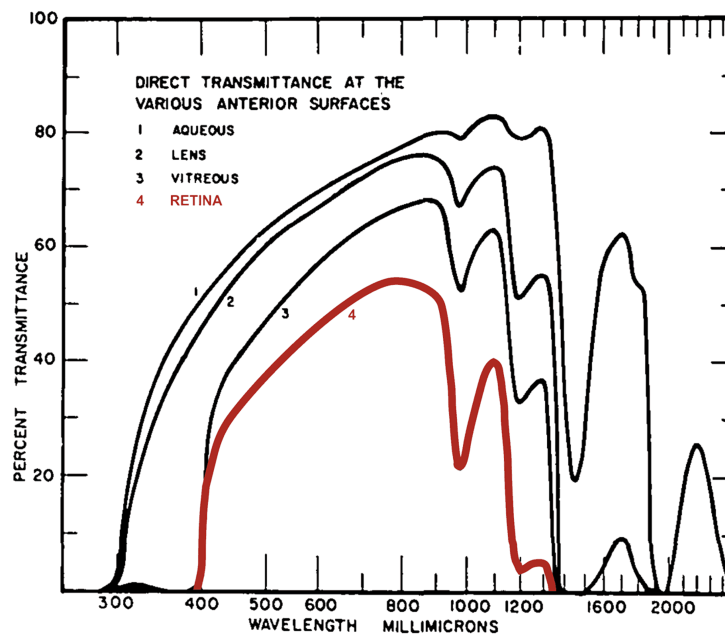


Abbildung 4.21: Transmission des direkten Lichtstrahls durch verschiedene Gewebeschichten des Auges. Die Spektren sind kumulativ; der Verlust durch frühere Gewebeschichten fließt in die Spektren tieferer Schichten mit ein. Auf der Retina kommt maximal nur etwa 55% des direkten Lichts an. Quelle: [58]

etwa $1.4 \mu\text{m}$ großen Partikeln [59]). Das aus einem einfallenden schmalen Lichtstrahl mit grünem Spektrum gestreute Licht erzeugt auf dem Augenhintergrund einen beleuchteten Bereich mit einer Halbwertsbreite von etwa 6 mm (berechnet mithilfe von [60]). Bei der Beleuchtung des Auges mit strukturierter Beleuchtung resultiert dies in einem recht konstanten Hintergrund im beobachteten Bereich. Die Streuung des Emissionslichtes, welches das Augeninnere durch die Linse verlässt, führt ebenfalls zu einer konstanten Hintergrundintensität.

Ein weiterer potentiell störender Faktor bei der Bildgebung des Augenhintergrundes ist ungewünschte Autofluoreszenz, welche im Augengewebe ausgelöst werden kann. In der Augenlinse befindliche Fluorophore bewirken die Gelbfärbung der Linse bei älteren Menschen [61]. Allerdings liegen die Anregungsspektren dieser Fluorophore im nahen ultravioletten Spektralbereich [62] und stellen daher kein Hindernis für die Bildgebung des Augenhintergrundes in der Region der gut sichtbaren Wellenlängen dar.

Im Allgemeinen bewirken die Absorptions-, Streuungs- und Fluoreszenzeffekte durch die okularen Medien zwar keinen Auflösungsverlust, aber eine Reduktion des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses.

4.4.5.2 Effekte der Lichtleitung durch die Photorezeptoren

Die wabenförmig angeordneten Sehrezeptoren am hinteren Rand der Retina fungieren als Lichtleiterfeld ([63]). Möchte man Bereiche abbilden, die – wie etwa das RPE – hinter

dieser Schicht liegen, muss dieser Effekt berücksichtigt werden. Auf makroskopischer Skala kann die Auswirkung wie die eines optischen Diffusors (Milchglasscheibe) betrachtet werden. Die Auflösung für Strukturen hinter den Rezeptoren ist daher proportional zu deren Entfernung von dieser Schicht (siehe Abb. 4.22).

Die Photorezeptoren haben eine näherungsweise normalverteilte winkelabhängige Transmittivität mit einer Standardabweichung von $6,7^\circ$ ([64]). Dieser Wert gilt für die dem Augenninneren zugewandte Seite. Im Folgenden wird angenommen, dass dies auch in umgekehrter Richtung gilt. Durch uns durchgeführte 3D-Untersuchungen des Augenhintergrundes zeigen, dass sich die meisten Lipofuszingranula auf der den Photorezeptoren zugewandten Seite der RPE-Zellen befinden. Der mittlere Abstand der Granula von der Photorezeptorenschicht beträgt lediglich ungefähr $2,5 \mu m$. Für Objekte mit diesem Abstand ergibt sich eine Standardabweichung des Abbildes hinter den Photorezeptoren von ungefähr $200 nm$. Das bedeutet, dass aufgrund des geringen Abstandes von Lipofuszin und Photorezeptorenschicht die Machbarkeit der hochauflösenden Untersuchung einzelner Granula (Durchmesser $1 \mu m$) durch die wellenleitende Eigenschaft der Photorezeptorenschicht prinzipiell nicht unterbunden wird. Sollte sich die rückseitige Winkelabhängigkeit von der dem Augenninneren zugewandten Seite um einen niedrigen einstelligen Faktor unterscheiden, gälte diese Feststellung ebenfalls.

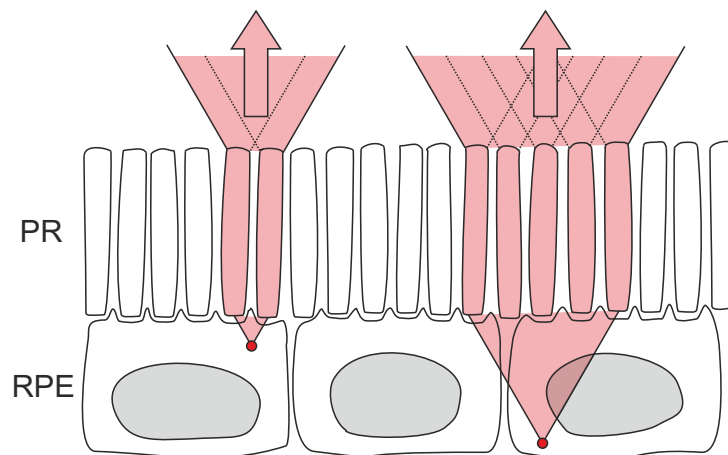


Abbildung 4.22: Die Photorezeptoren (PR) fungieren als Lichtleiter. Licht, welches von dahinterliegenden Lichtquellen im RPE (rote Punkte) ausgestrahlt wird, nimmt einen Radius auf den Photorezeptoren ein, welcher proportional zu ihrer Entfernung von der Photorezeptorenschicht ist.

Die Winkelabhängigkeit hat allerdings noch geringfügig den Effekt einer Verbreiterung der beugungsbegrenzten PSF zur Folge, da weit abgelenkte Strahlen weniger wahrscheinlich sind, als die Photorezeptoren koaxial verlassende. Da die PSF allerdings in großem Maß durch die Brechungsfehler des Auges verbreitert wird (folgt im nächste Abschnitt 4.4.5.3), ist dieses Phänomen zu vernachlässigen.

Auf mikroskopischer Skala ergibt sich durch die Rezeptoren mit einem Durchmesser von etwa $3 \mu m$ zusätzlich eine Rasterung des Bildsignals. Die Auswirkung kann in Abbil-

dung 4.23 beobachtet werden. Dieses Bild zeigt die RPE-Seite einer frisch präparierten menschlichen Retina, welche von der Augennenseite mit einem Streifenmuster beleuchtet wurde. Wenn die Wellenlänge des Streifenmusters den doppelten Abstand der Photorezeptoren unterschreitet, kann dieses Gitter aufgrund der Überschreitung der Shannon-Nyquist'schen Abtastgrenze nicht mehr korrekt übertragen werden. Die Abbildung liefert einen Anhaltspunkt für das Ergebnis der strukturierten Beleuchtung des Augenhintergrundes auf die Ebene des RPE. Wegen der durch die Rezeptoren gegebene Abtastgrenze können Bilder durch die Photorezeptorenschicht nur mit einer Auflösung von $6\mu m$ (frequenzbasierte Abbe'sche Definition) übertragen werden. Aufgrund der dieses Effektes ist es umgekehrt nicht sinnvoll, ein Beleuchtungsgitter einzustrahlen, dessen Wellenlänge in die Regionen des Photorezeptorenabstandes vorstößt. Als untere Grenze für das eingestrahelte Muster ergibt sich daher ebenfalls ein Gitterabstand von etwa $6\mu m$.

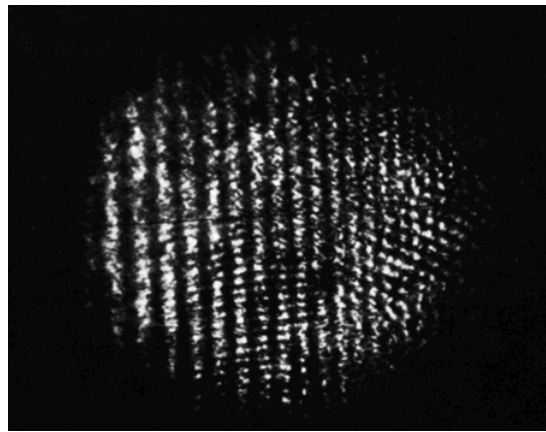


Abbildung 4.23: Zu sehen ist ein Bild der RPE-Seite der Photorezeptorenschicht, welche von der gegenüberliegenden Seite mit einem Streifenmuster beleuchtet wurde. Die Frequenz des Musters erhöht sich von links nach rechts. Für hohe Frequenzen kann das Muster nicht mehr übertragen werden. Quelle: [56]

4.4.5.3 Abbildungsfehler des Auges

Die Augenlinse und die Hornhaut als gewachsene organische Objekte sind in ihren Brechungseigenschaften wesentlich schlechter als geschliffene Linsen aus Glas, wie sie für gewöhnlich in der Optik verwendet werden. Die Oberfläche der Hornhaut verliert in der Regel mit steigendem Alter zunehmend an Ebenheit aufgrund von feinen Verletzungen und Infektionen, welche zur Narbenbildung führen. Die Brechungseigenschaft der Augenlinse dagegen weicht schon in jungen Jahren von der einer sphärischen Linse ab, wird aber insbesondere in der zweiten Lebenshälfte zunehmend fehlerbehafteter. Die Brechungseigenschaften eines Linsensystems lassen sich gut durch die Zerlegung der räumlich variierenden Phasenverschiebung in eine Linearkombination von Zernike Polynomen beschreiben. Die Zernike Polynome in kartesischen Ortskoordinaten und ihr Einfluss auf die Punktbildfunktion sind in Abbildung 4.24 dargestellt. Die Gewichtung der Polyno-

me nimmt im allgemeinen mit steigender radialer Ordnung und steigender Ordnung der Azimutfrequenz ab.

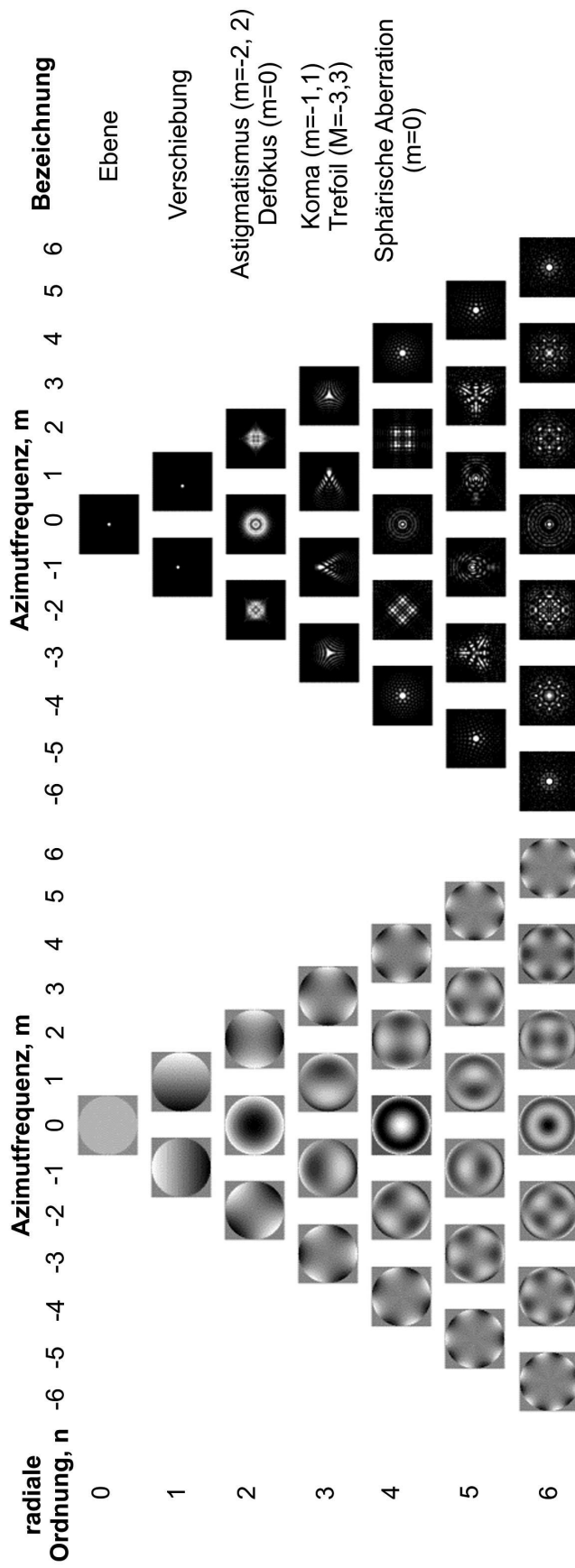


Abbildung 4.24: Die Zernikepolynome (linke Seite) beschreiben die Phasenverschiebung durch ein optisches System in Abhängigkeit von Azimutwinkel und Radius. Hier sind sie in kartesischen Ortskoordinaten abgebildet. Auf der rechten Seite ist ihre Auswirkung auf die Punktbildfunktion in der Fokusebene dargestellt. Quelle: [65]

Während die Polynome der ersten radialen Ordnung lediglich einen Versatz des Bildes bewirken, beschreiben die Polynome der zweiten radialen Ordnung den Defokus (Fehlsichtigkeit, also Kurz- bzw. Weitsichtigkeit) und den Astigmatismus (zylindrische Brechung). Die dritte radiale Ordnung erzeugt Koma und Trefoil (in der Regel weniger stark ausgeprägt). Eine weitere am Auge oft stark einfließende Zernike-Mode ist die sphärische Aberration ($n = 4, m = 0$). Mit Brillengläsern zur Korrektur der Abbildungsfehler lassen sich Fehlsichtigkeit, Astigmatismus und sphärische Aberration ausgleichen.

Die Polynome höherer Ordnung können hiermit jedoch nicht korrigiert werden. Dies liegt im wesentlichen an der starken Ortsabhängigkeit des notwendigen Phasenversatzes (abhängig von der Blickrichtung).

Am Auge führen insbesondere die Moden höherer Ordnung, welche im wesentlichen von Hornhautkrümmungen herrühren, in ihrer Summe zu einer starken Verbreiterung der Punktbildfunktion. Dieser Einfluss korreliert positiv mit dem Pupillendurchmesser und damit mit der numerischen Apertur des Auges. Dies führt dazu, dass die Auflösungsfähigkeit bei einem gewöhnlichen menschlichen Auge bei relativ weit geschlossener Pupille am höchsten ist, obwohl dies gleichbedeutend mit einer niedrigen numerischen Apertur und damit einer fundamental begrenzten Auflösung ist (siehe Abbildung 4.25).

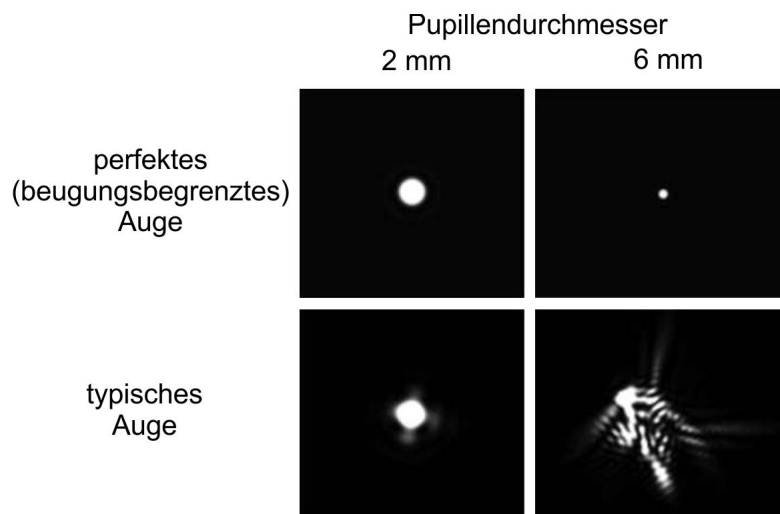


Abbildung 4.25: Abhängigkeit der Punktbildfunktion des menschlichen Auges vom Durchmesser der Pupille. Für ein perfektes Auge verbessert sich die Auflösung bei Vergrößerung der Pupille. Bei einem realen menschlichen Auge verschlechtert sich hingegen die Auflösung durch den verstärkten Einfluss der Aberrationen. Quelle: [66]

4.4.5.4 Natürliche Augenbewegungen

Das menschliche Auge vollzieht während des Sehvorgangs mehrere verschiedene Bewegungen. Die größten Winkeländerungen werden hierbei durch die sogenannten Sakkaden vollzogen. Die Sakkaden bezeichnen das mehr oder weniger willkürliche ruckartige Fixieren verschiedener Bildbereiche mit dem Auge.

Allerdings bewegt sich das Auge auch, wenn der Blick auf einem bestimmten Bildbereich ruht. Diese Rotationsbewegungen um den Mittelpunkt des Auges auf einer Skala bis etwa einem halben Grad, was einer Verschiebung des Augenhintergrundes um $200\mu\text{m}$ entspricht, lassen sich nicht bewusst steuern. Diese unwillkürlichen Bewegungen sind beispielhaft in ihrem zeitlichen Verlauf in Abbildung 4.26 dargestellt. Sie lassen sich einteilen in

- **Mikrosakkaden:** Diese Bewegung ist den Sakkaden ähnlich, hat allerdings geringere Amplituden im Bereich einer Verschiebung des Augenhintergrundes von etwa $100\mu\text{m}$. Zwischen diesen ruckartigen Bewegungen steht das Auge verhältnismäßig still über einen Zeitraum zwischen 100ms und einer 1s .
- **okularer Tremor:** Hiermit wird eine schwingende Bewegung mit einer Frequenz von etwa 80Hz und einer Amplitude zwischen 150 und 2500nm bezeichnet.
- **okularer Drift:** Die einigermaßen gleichmäßige Bewegung des Auges mit einer Geschwindigkeit von etwa $25\mu\text{m/s}$ wird okularer Drift genannt.

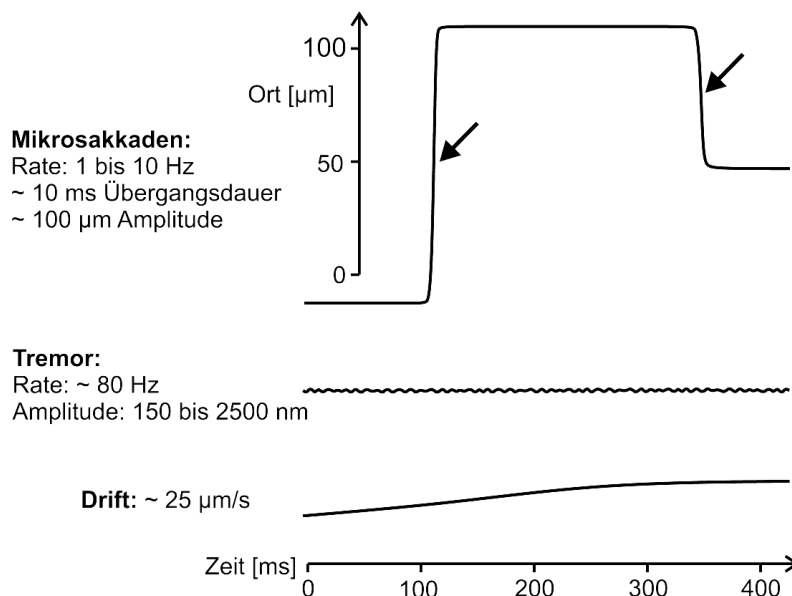


Abbildung 4.26: Die unwillkürlichen Augenbewegungen lassen sich in drei additive Grundbewegungen zerlegen. Lediglich die ruckartigen Mikrosakkaden (Pfeile) überspannen Entfernungen von über $10\mu\text{m}$ in einem Zeitbereich unter 100ms . Zwischen den Mikrosakkaden bewegt sich das Auge nur auf einer Skala weniger Mikrometer.

Aufgrund der Natur der unwillkürlichen Augenbewegungen ist eine scharfe Bildgebung des Augenhintergrundes nur in Zeitfenstern möglich, welche zwischen den einzelnen Mikrosakkaden liegen. Erfolgt die Aufnahme von einzelnen Bildern des Auges mit fester Frequenz und ist damit nicht auf die Mikrosakkaden synchronisiert, ist es notwendig, die jeweilige Aufnahmedauer deutlich kleiner als die der Mikrosakkaden zu halten, damit die relative Anzahl der während der Mikrosakkaden aufgezeichneten Bilder gering ist.

5 Methoden

5.1 Bildzusammenführung

5.1.1 Motivation

In den Grundlagen 4.1.6 wurde bereits beschrieben, dass der Pixelabstand in der hochauflösenden Weitfeldmikroskopie (in Längeneinheiten des Objektraums) etwa 60 bis 80 nm betragen muss, um die übertragbare Objektinformation im Bild aufzeichnen zu können.

Bei gängigen Pixelzahlen von etwa 500 bis 2000 Pixeln entlang der kürzeren Seite des Chips ergeben sich hiermit Durchmesser des erfassbaren Bereichs von lediglich 30 bis 160 μm .

Die erfassbaren Längen sind in der Regel geeignet, um einzelne Zellen komplett aufzuzeichnen. Zur Untersuchung von zusammenhängenden Strukturen, wie beispielsweise von biologischem Gewebe sind sie allerdings unzureichend.

Dieses Problem kann man allerdings – so lange sich die zu untersuchende Struktur nicht mit der Zeit verändert – umgehen, indem man schlicht mehrere Einzelbilder aneinanderhängt. Dieses Vorgehen, welches *image stitching* (Aneinanderheften von Bildern) genannt wird, ist jedem z.B. durch Panoramafunktionen von Digitalkameras und Smartphones bekannt. Hierzu gibt es eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten, welche sich mit der Korrektur von Bewegungsartefakten, Bildfeldwölbung, perspektivischer Verzerrung, Farbunterschieden und weiteren Themen befassen.

In der hochauflösenden Mikroskopie spielt aber die Bildverzerrung und auch die ortsabhängige chromatische Aberration in der Regel keine große Rolle solange der beobachtbare Bereich klein gegenüber der theoretisch abbildbaren Fläche des verwendeten Objektivs ist. In der Fluoreszenzmikroskopie stellen zum einen die hohe Anzahl der Bildpunkte (bei 3D-Aufnahmen) und zum anderen das Bleichen der Fluorophore die wesentlichen Herausforderungen dar.

Die konkrete Aufgabenstellung, die zur Beschäftigung mit dem Thema *image stitching* geführt hatte, lag darin, das Gewebe des retinalen Pigmentepithels großflächig dreidimensional aufzuzeichnen, um zu sehen, wie sich die Verteilung der Lipofuszingranula auf größerer Skala gestaltet. Das RPE lag flächig präpariert vor. RPE-Aderhaut wurde hierzu mit dem RPE als vorderste Schicht auf ein Deckglas aufgebracht.

Das zur Verfügung stehende Kombimikroskop (siehe Kapitel 4.3) verfügt über eine Länge der beobachtbaren Region von 66 μm . Bei der Verwendung strukturierter Beleuchtung besitzt allerdings der beleuchtete, kreisförmige Bereich nur einen Durchmesser von 61 μm . Dieser Umstand ist hierbei dem optischen Aufbau (den Ausmaßen des Strahlteilerwürfels, der Aufweitung des Laserstrahls) geschuldet. Theoretisch könnte also ein der

ganzen Chipfläche entsprechender Bereich in der Probe beleuchtet werden. Dennoch wären die erreichte Fläche zu klein, um vier aneinander gereihte RPE-Zellen entlang einer Raumdimension gleichzeitig zu betrachten.

Die rechteckige, durch die Kamera aufgezeichnete Fläche (ROI⁶) muss nochmals kleiner als der Beleuchtungsfleck sein, um voll innerhalb dieser Fläche zu liegen.

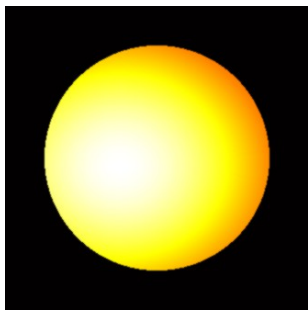
Da RPE-Zellen im Gewebe eine verhältnismäßig große Tiefe von ungefähr 15 μm besitzen, müssen für dreidimensionale Aufnahmen mindestens 50 einzelne Ebenen bei verschiedenen Fokustiefen aufgezeichnet werden um die Abtastgrenze entlang z (der optischen Achse) einzuhalten. Da für jede Ebene wiederum 9 Einzelbilder mit verschiedenem Gitter aufgenommen werden müssen, ergeben sich insgesamt 450 Einzelbilder für eine verwendete Anregungswellenlänge. Das vom Objektiv kommende Licht durchleuchtet hierbei jeweils die Probe in der gesamten Tiefe. Durch die große Zahl der Bilder und die damit verbundene hohe Gesamtbeleuchtungsdauer tritt ein verhältnismäßig starkes Fluoreszenzbleichen in der Probe auf. Da der beleuchtete Bereich größer ist als die ROI, werden angrenzende Bereiche ebenfalls beleuchtet und ausgebleicht (siehe Abbildung 5.1). Die in der Fokusebene interferierenden Strahlen des Anregungslichtes besitzen einen Winkel gegenüber der optischen Achse, weswegen die durch die Anregungsstrahlen abgedeckten Volumina diagonal in der Probe liegen. Bei Änderung der Fokusposition entlang z wandern diese Volumina kongruent. Im Endeffekt führt die Aufnahme einer Region zu einem großvolumigen inhomogenen Ausbleichen in der Umgebung. Wird im Anschluss die Probe verschoben, um einen angrenzenden Bereich aufzuzeichnen, muss das erfolgte Bleichen berücksichtigt werden, da es sonst bei nach der Zusammenführung der Aufnahmen zu deutlichen Verfremdungen der dargestellten Helligkeit kommt.

Zunächst wurde geprüft, ob bereits Software existiert, die zur Zusammenführung der Daten verwendet werden kann.

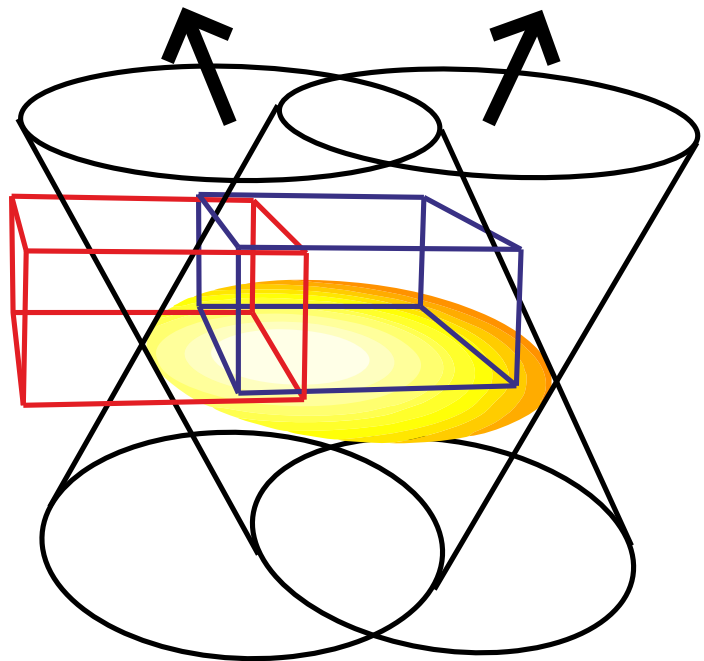
Für Mikroskopiezwecke steht für das Bildanalyseprogramm ImageJ bzw. das Derivat Fiji (**fiji is just imageJ**) ein quelloffenes *image stitching plugin* zur Verfügung ([67],[68]). Dieses Programm verfügt allerdings über keine Korrektur des Fluoreszenzbleichens und war daher ungeeignet.

Ein selbstständig lauffähiges, quelloffenes, auf C++ basierendes Programm für *image stitching* von Fluoreszenzmikroskopiedaten ist XuvTools ([69],[70]). XuvTools unterstützt die Korrektur von Fluoreszenzbleichen und wurde im Wesentlichen für Konfokalmikroskopie entwickelt. Die Bleichkorrektur ist allerdings für strukturierte Beleuchtung ungeeignet. Zum einen wird für das Bleichen ein lineares Modell angenommen, was lediglich für geringfügiges Bleichen näherungsweise zutrifft, zum anderen wird die Stärke des Bleichens in

⁶Ein ausgewählter Ausschnitt aus einem größeren Bild wird für gewöhnlich als ROI (von engl. *region of interest*) bezeichnet. Das Wort ROI wird fließend in einer Silbe ausgesprochen, weswegen es im englischen auch oft kleingeschrieben wird. Als Plural wird das Wort ROIs verwendet.



(a) Die Intensitätsverteilung der Anregung ist inhomogen.



(b) Bei der Aufnahme einer Ebene (hier der untersten) einer Region (blauer Kasten), werden Bereiche der angrenzenden, noch aufzuzeichnenden Region (roter Kasten) bereits beleuchtet. Die interferierenden Strahlen der Strukturierten Beleuchtung (schwarze Zylinder) liegen diagonal im Objektvolumen

Abbildung 5.1: Bei Aufnahmen mit strukturierter Beleuchtung werden auch nicht aufgezeichnete Bereiche in charakteristischer Weise beleuchtet und dadurch ausgeblendet, was bei der Bildzusammenführung berücksichtigt werden muss.

angrenzenden Bildern außerhalb des überlappenden Bereiches vereinfacht als normalverteilt angenommen, was für Konfokalmikroskopie eine gute Näherung darstellt, für strukturierte Beleuchtung allerdings nicht anwendbar ist.

Da keine Software zu finden war, die die Bildzusammenführung mit Korrektur des Bleicheffekts ermöglichte, wurde ein entsprechendes Verfahren entwickelt.

5.1.2 Bleichkorrektur

Das Fluoreszenzbleichen wird dadurch hervorgerufen, dass einzelne Fluorophore den Fluoreszenzvorgang mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit nicht unbeschadet überstehen, sondern in einen nicht mehr fluoreszierenden Zustand wechseln.

Bei dem Bleichen handelt es sich also um einen stochastischen Zerfallsprozess. Es wird von folgende Voraussetzungen ausgegangen:

- Der Zeitraum, in dem sich die Fluorophore im Grundzustand befinden, ist sehr viel größer als die Summe der Zeiten für andere Zustände, die während des Fluoreszenzvorgangs durchlaufen werden.
- Alle Fluorophore im Grundzustand besitzen in Bezug auf die Lichtabsorption im zeitlichen Mittel den gleichen Wirkungsquerschnitt.
- Die Wahrscheinlichkeit des Zerfalls während eines Fluoreszenzvorgangs ist für alle Fluorophore identisch.
- Das Licht wird nur zu einem vernachlässigbaren Teil von der Probe absorbiert.
- Während der Aufnahme einer einzigen Ebene werden die in dieser Aufnahme aufgezeichneten Fluorophore nur in einem vernachlässigbaren Maß gebleicht.
- Die Auflösung der Bilder ist hoch gegenüber der Auflösung des resultierenden Beleuchtungsfeldes.

Unter diesen Annahmen zerfällt die Dichte der aufgezeichneten anregbaren Fluorophore ρ des Objektes exponentiell in Abhängigkeit der zeitlich integrierten eingestrahlt Lichtintensität w .

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_0(\mathbf{r}) e^{-\gamma w(\mathbf{r})} \quad (5.1)$$

Die zeitlich integrierte Beleuchtungsintensität w ist den Einheiten nach eine Energieflächendichte, doch diese Bezeichnung ist irreführend, da nur ein geringer Teil der

eingestrahnten Energie von der Probe absorbiert wird. Daher wird w im folgenden Bestrahlungskarte genannt.

Werden die Fluorophore in einer Ebene z_i in der ROI mit dem Index j aufgezeichnet, wird durch die Aufnahme dieser Ebene ein Volumen in der Umgebung der betrachteten Fläche beleuchtet. Die Bestrahlung durch die Einzelaufnahme $w'_i(\mathbf{r})$ ist durch

$$w'_i(\mathbf{r}) = I_i(\mathbf{r}) \tau \quad (5.2)$$

mit der Aufnahmedauer τ gegeben. Die während dieser Aufnahme auftretende Intensitätsverteilung $I_i(\mathbf{r})$

$$I_i(\mathbf{r}) = I_0(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \quad , \quad \mathbf{r}_i = \begin{pmatrix} x_j \\ y_j \\ z_i \end{pmatrix} \quad (5.3)$$

ist identisch für alle Aufnahmen, aber jeweils an den Aufnahmeort \mathbf{r}_i verschoben. Die Referenzintensitätsverteilung $I_0(\mathbf{r})$ wird zunächst als bekannt angenommen.

Während die x - und y -Koordinate des Aufnahmeortes für jeweils eine ROI (mit dem Index j gekennzeichnet) konstant bleiben (sie werden lediglich durch das laterale Verschieben der Probe geändert), verschiebt sich die Intensitätsverteilung in der z -Richtung immer mit der aufgenommenen Fokusebene z_i .

Die für die aufgezeichnete Fluorophordichte in einer Fokusebene bei $z = z_i$ nach (5.1) wirkende Bestrahlungskarte ergibt sich durch die Summe der Einzelbestrahlungen aller zuvor aufgenommenen Bereiche:

$$w_{2D,i}(x, y) = \sum_{n=1}^{i-1} w'_n(\mathbf{r}) \Big|_{z=z_i} \quad (5.4)$$

Aus dieser zweidimensionalen Bestrahlungskarte lässt sich die wirkende Bestrahlung für das in einer ROI aufgezeichnete Volumen Ebene für Ebene zusammensetzen.

$$w_{ROI,j}(x, y) = \sum_{i \in ROI,j} \delta(z - z_i) w_{2D,i}(x, y) \quad (5.5)$$

Eine Bestrahlungskarte für eine ROI ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass zuvor eine andere ROI rechts neben der dargestellten aufgezeichnet wurde, weswegen kreisförmig die Bestrahlung auf der rechten Seite der ROI erhöht ist. Auf der linken Seite, welche nicht durch die Aufnahme der vorherigen ROI beleuchtet wurde, steigt der Bestrahlungswert ungefähr linear mit der Tiefe z an, da die Aufnahmesequenz

entlang z von unten nach oben verläuft und dadurch höher liegende Bereiche zur Zeit ihrer Aufzeichnung bereits durch die Aufnahme der tieferen Ebenen eine Bestrahlung erfahren haben.

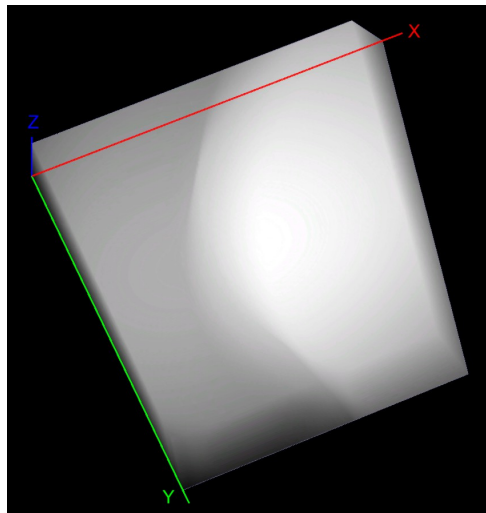


Abbildung 5.2: Bestrahlungskarte einer ROI. Da zuvor bereits die zur rechten Seite angrenzende ROI aufgenommen wurde, ist bereits in Teil der aktuellen ROI beleuchtet worden, was durch die höheren Bestrahlungswerte auf der rechten Seite wiedergegeben wird.

Um ausgehend von der Bestrahlungskarte den vom Bleichen herrührenden Helligkeitsverlust ausgleichen zu können, muss allerdings auch die Zerfallskonstante λ bekannt sein. Diese variiert allerdings in der Regel von Probe zu Probe, da sie stark von der chemischen Umgebung bzw. ihrem Alter und ihrer Lagerung abhängt. Aus diesem Grund wird die Bleichkonstante λ aus den erhaltenen Bildern *a posteriori* ermittelt. Für das Anwenden von *image stitching* ist es in der Regel erforderlich, die einzelnen ROIs mit einem Überlapp aufzunehmen, also den beobachteten Bereich nur so weit zu verschieben, dass ein Teil des Objekts in mindestens zwei ROIs abgebildet ist (siehe Abbildung 5.4). Dieser Überlapp wird dann zur genauen Bestimmung der relativen Positionierung der beiden Bereiche verwendet. In der entwickelten Software wird hierzu eine Phasenkorrelation (siehe Grundlagen 4.1.8) der überlappenden Bildbereiche angewandt. Dieser Überlapp wird ebenfalls zur Bestimmung der Bleichkonstanten verwendet.

Da angenommen wird, dass die (SIM-)PSF des Bildes klein gegenüber der räumlichen Änderung der Bestrahlungskarte ist, wird sie in den Berechnungen als Deltadistribution angenommen und daher aus den Gleichungen gestrichen:

$$I_i(\mathbf{r}) = [\rho_i(\mathbf{r}) \cdot Illu_i(\mathbf{r})] * h_{\text{SIM}}(\mathbf{r}) \stackrel{!}{=} \rho_i(\mathbf{r}) \cdot Illu_i(\mathbf{r}) \quad (5.6)$$

Hiermit ergibt sich unter Verwendung der Zerfallsgleichung (5.1) für das in einer ROI aufgezeichnete Bild in der Zusammenhang

$$e^{\lambda w_{ROI,i}(\mathbf{r})} \frac{I_i(\mathbf{r})}{Illu_i(\mathbf{r})} = \rho_0(\mathbf{r}) \quad (5.7)$$

mit der ungeblichenen Fluorophordichte $\rho_0(\mathbf{r})$, welche allerdings unbekannt ist. Zur Lösung der Gleichung nach λ kann man einen Bildbereich betrachten, welcher von zwei benachbarten ROIs mit den Indizes i und j abgedeckt wird. Durch Gleichsetzen von (5.7) für den überlappenden Bereich der beiden ROIs nach $\rho_0(\mathbf{r})$ erhält man

$$e^{\lambda(w_{ROI,i}(\mathbf{r})-w_{ROI,j}(\mathbf{r}))} = \frac{I_j(\mathbf{r})Illu_i(\mathbf{r})}{I_i(\mathbf{r})Illu_j(\mathbf{r})} \quad (5.8)$$

$$\lambda = \frac{\ln [I_j(\mathbf{r})] + \ln [Illu_i(\mathbf{r})] - \ln [I_i(\mathbf{r})] - \ln [Illu_j(\mathbf{r})]}{w_{ROI,i} - w_{ROI,j}} \quad (5.9)$$

In der Praxis ergibt sich durch diese Rechnung eine für jedes Bildvoxel (3D Pixel) unterschiedliche Bleichkonstante, da das rekonstruierte SIM-Bild durch Rauschen beeinflusst ist. Insbesondere bei sehr kleinen oder gar negativen Werten für die Bildintensität lässt sich die Zerfallskonstante nicht berechnen. Außerdem wird das Bildsignal nicht ausschließlich durch die zu untersuchenden Fluorophore hervorgerufen. Im Allgemeinen sind zusätzlich andere, unspezifisch autofluoreszierende Strukturen im Bild mit geringer Intensität im Bild vorhanden.

Um ein gemeinsames konstantes λ für die gesamte Aufnahmeserie zu berechnen, werden daher lediglich helle Bereiche des Bildes verwendet, welche von den primären Fluorophoren herrühren. Die erhaltenen λ werden unter Verwendung aller überlappenden Bereiche der Aufnahmeserie gewichtet gemittelt.

Nach der Bestimmung der Bleichkonstanten kann die Helligkeit der Bilder aller ROIs korrigiert werden nach dem Schema

$$C_i(\mathbf{r}) = \frac{I_i(\mathbf{r})}{Illu_{f,i}(x,y)} e^{\lambda w_{ROI,i}(\mathbf{r})} . \quad (5.10)$$

In die korrigierte Helligkeit $C_i(\mathbf{r})$ fließt hierbei auch die Korrektur nach der Beleuchtungsintensität ein. Hierzu wird das Signal durch die Beleuchtungsintensität in der Fokusebene $Illu_{f,i}(x,y)$ geteilt. Diese ist identisch für alle z -Positionen und daher nur von den Raumrichtungen x und y abhängig.

5.1.3 Arbeitsablauf

Die beschriebene Bleichkorrektur stellt nur einen – wenn auch den wesentlichen – Aspekt dar, welcher durch das *image stitching* abgedeckt werden muss. Die im Rahmen der Bild-

zusammenführung durchgeführten Schritte werden im Folgenden erläutert. Zum Nachvollziehen der Arbeitsschritte und der verwendeten bzw. erzeugten Daten kann das Schaubild in Abbildung 5.3 dienen.

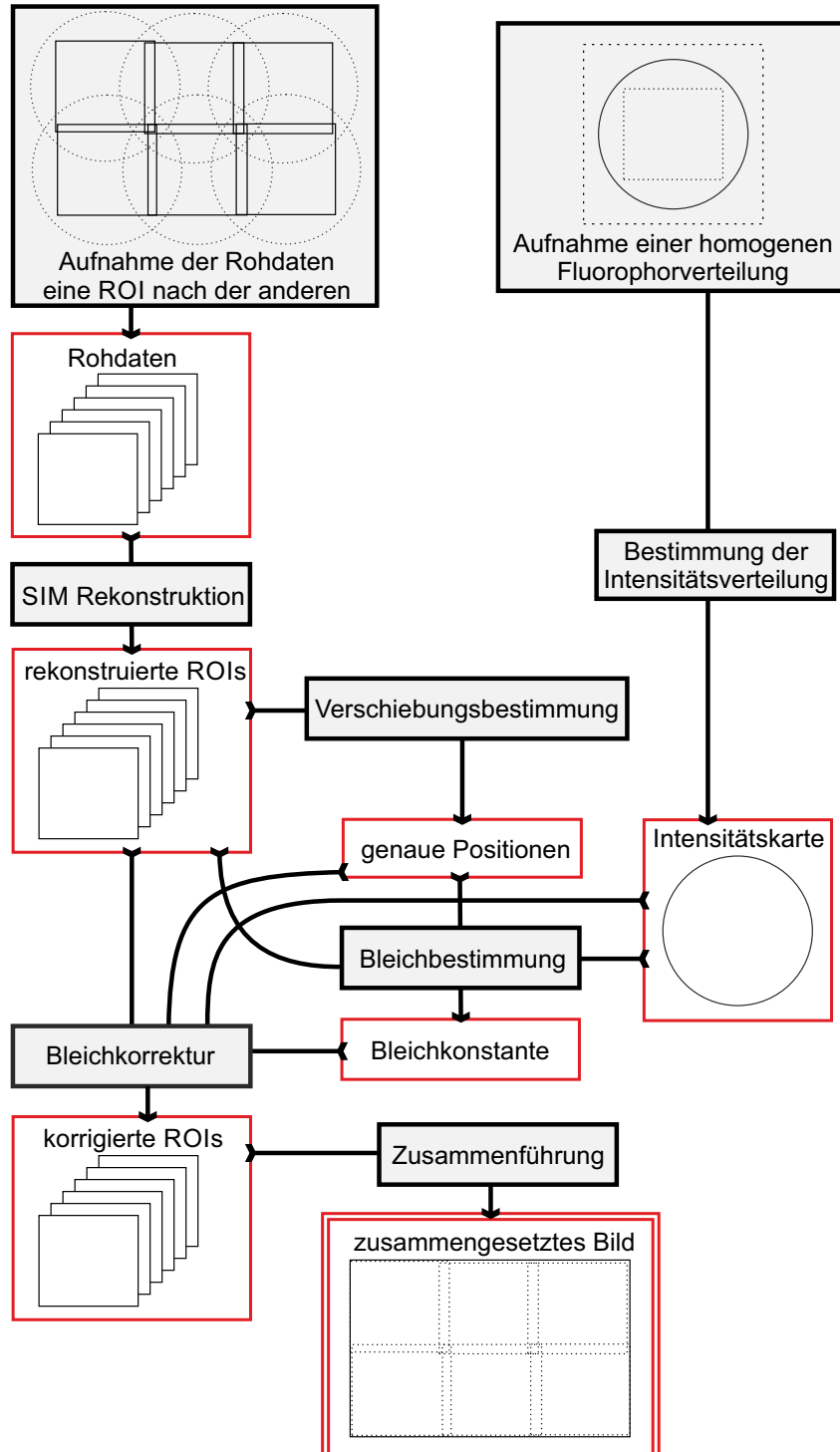


Abbildung 5.3: Ablaufschaubild der Bildzusammenführung. Die Arbeitsschritte sind schwarz umrahmt, während die Daten durch rote Umrahmung gekennzeichnet sind.

Verschiebungsbestimmung

Da die Genauigkeit, mit welcher die Probe in der x - y -Ebene verschoben werden kann

(> 1 μm) niedriger als die Auflösung der Bilder (ca. 100 nm) ist, muss die genaue relative Positionierung der einzelnen ROIs bestimmt werden. Wie bereits kurz erwähnt, werden hierzu die überlappenden Bildbereiche korreliert. Der Software muss für diesen Zweck die ungefähre Positionierung vorgegeben werden, die durch den Controller des Objektverschiebetisches angesteuert wurde. Die überlappenden Bereiche von jeweils zwei ROIs werden ausgeschnitten und phasenkorreliert (siehe Grundlagen 4.1.8). Durch den gemeinsamen Bildinhalt (siehe Abbildung 5.4) ergibt sich in der Phasenkorrelation ein Peak am Ort des Verschiebungsvektor, dessen Schwerpunkt mit hoher Genauigkeit bestimmt werden kann.

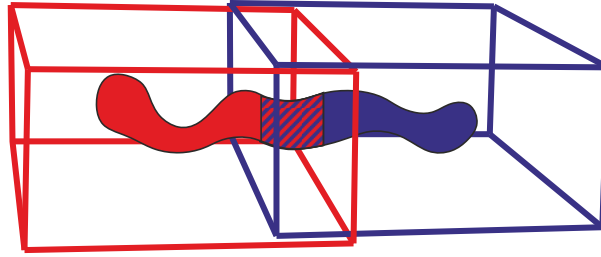


Abbildung 5.4: Anhand der innerhalb zwei ROIs liegenden abgebildeten Objektinformation (schraffierter Bereich) kann die Verschiebung zwischen den ROIs bestimmt werden.

Die erhaltenen subpixelgenauen relativen Verschiebungswerte Δpos_{ij} (zur Vereinfachung wird hier kein weiterer Index für die Ortsdimension eingeführt) werden zunächst in einer Liste gespeichert. Aus den relativen Positionen von jeweils zwei ROIs müssen nun die globalen Positionen ermittelt werden. Dieses Problem ist in der Regel überbestimmt, da die ROIs normalerweise rechteckig, also sowohl in x -, als auch in y -Richtung, aneinandergehängt werden und es daher mehr Überlappbereiche als ROIs gibt. Die Positionsbestimmung wird sequentiell für alle drei Raumrichtungen iterativ mithilfe gradientenbasierter Minimierung durchgeführt. Für die ROI mit dem Index i wird hierzu im m -ten Iterationsschritt der Gradient

$$grad_i^m = \sum_j \frac{pos_i^m - pos_j^m - \Delta pos_{ij}}{s_{ij}} \quad (5.11)$$

vorgegeben. Der Summenindex j läuft jeweils über alle ROIs, die einen Überlapp mit der aktuellen ROI i besitzen. Der Gradient ist hiermit also proportional zur Abweichung der gemessenen Verschiebung von der letzten Schätzung. Eine Gewichtung in Abhängigkeit der Genauigkeit der Messwerte wird durch die Division des Gradienten durch einen Wert s_{ij} proportional zur zu erwartenden Ungenauigkeit der Positionsbestimmung erreicht. Diese Ungenauigkeit ist allerdings schwierig abzuschätzen. Es wurde $1/\sqrt{n}$ mit der Voxelzahl im Überlapp n verwendet. Der Fehlerwert der Positionsbestimmung wird durch

$$err^m = \sum_i \frac{(grad_i^m)^2}{2} \quad (5.12)$$

vorgegeben, womit sich der Fehler und sein Gradient decken. Die Minimierungsfunktion (hier `minfunc`) wendet im folgenden Schritt den Fehlergradienten mit einer durch sie selbst ermittelten Schrittweite a_i an, um iterativ zum Optimum zu gelangen.

$$pos_i^{m+1} = pos_i^m - a_i grad_i^m \quad (5.13)$$

Durch das iterative Verfahren zur Ermittlung der Positionen der einzelnen ROIs wird somit die kleinste Quadrate-Lösung für die gegebenen relativen Verschiebungen zwischen jeweils zwei ROIs erhalten. Die Position der ersten ROI (ihres ersten Voxels) wird als Referenzpunkt verwendet. Um am Ende die ROIs genau zusammenfügen zu können werden die einzelnen Bereiche zunächst subpixelgenau verschoben um die Differenz ihrer exakten Position von der nächsten ganzen Zahl. Im Resultat ist die Verschiebung zwischen den einzelnen ROIs ganzzahlig, wodurch diese später einfacher zusammengefügt werden können.

Intensitätskalibrierung und Bleichkorrektur

Im nächsten Schritt wird die oben beschriebene Bestimmung der Bleichkonstante und die Korrektur der Helligkeit der einzelnen Bereiche durchgeführt.

Um die in dem Verfahren verwendete Beleuchtungsmaske berechnen zu können, muss die Beleuchtungsintensität in der Fokusebene des Objekts dem Programm vorgegeben werden. Um diese zu erzeugen, wurde ein homogen fluoreszierendes Kalibrierungsobjekt verwendet. Dazu wurde eine Lösung mit einer hohen Konzentration von fluoreszierenden Mikropartikeln (100 nm Kügelchen) zwischen Deckglas und Objektträger aufgebracht. Um einen kleinen Abstand zwischen Deckglas und Objektträger und damit eine geringe Tiefe der Intensitätskalibrierungsstruktur zu erhalten, wurde nur ein kleiner Tropfen der Lösung verwendet (ca. 1 μ l) sodass das Volumen unter dem Deckglas nur etwa zur Hälfte mit der Lösung benetzt war. Die auftretende Adhäsionskraft führt hierdurch zu einer Anziehung von Deckglas und Objektträger. Zusätzlich wurde das Deckglas auf den Objektträger gepresst. Die Dicke der fluoreszierenden Schicht lag dadurch lediglich bei ungefähr 10 μ m. Die Kalibrierungsstruktur wurde mit mehreren Einzelbildern aufgenommen und das SIM-Beleuchtungsmuster wurde von Bild zu Bild verschoben. Die Einzelbilder wurden gemittelt, um Effekte des Beleuchtungsmusters und der sich thermisch bewegenden Partikel zu verschmieren. Der Hintergrundwert der Helligkeit wurde separat ohne Laserbeleuchtung gemessen und vom Ergebnis abgezogen. Anschließend wurde ein Bereich innerhalb der kreisförmigen Beleuchtungsregion ausgeschnitten und es wurden Normalverteilungen in x - und y -Richtung separat eindimensional an die Daten gefittet um die Standardabweichungen zu bestimmen. Das Fitten einer Normalverteilung ist physikalisch damit begründet, dass Laser in der Grundmode (TEM 00) einen normalverteilten Strahlquerschnitt besitzen. Die erhaltene gefittete Funktion ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Die

zu sehende Fluktuation der Helligkeit rührt von der Inhomogenität des Kalibrierungsobjekts her, da sich einzelne fluoreszierende Partikel an die Glasflächen hefteten. Wegen der Verwendung eines Fits der sehr breiten Verteilung ist der Einfluss dieser zufälligen Fluktuationen aber gering.

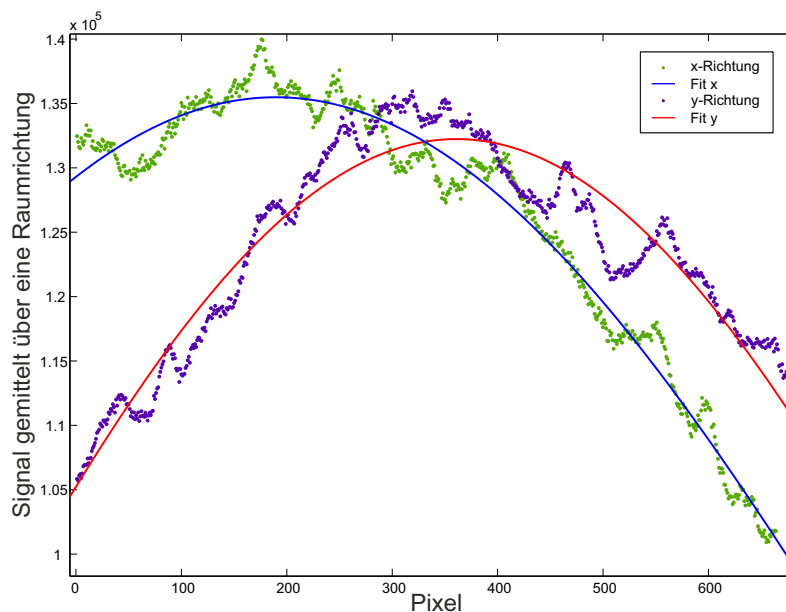


Abbildung 5.5: Fit der Beleuchtungsintensität Anhand des Signals einer mehr oder weniger homogenen Fluorophorverteilung.

Der Mittelpunkt der Beleuchtungsfläche (diese ist durch eine Aperturblende in einer konjugierten Bildebene im Beleuchtungsstrahlengang vorgegeben) wurde durch Schwerpunktbestimmung der Fläche ermittelt (um die Fläche zu erhalten wurde zunächst eine Schwellwertmaske aus dem Kalibrierungsbild generiert). Der Durchmesser der Fläche wurde manuell am gemittelten Bild gemessen (mehrfache Messung des Durchmessers unter unterschiedliche Winkeln mit anschließender Mittelwertbildung). Aus dem nun bekannten Modell einer zweidimensionalen Normalverteilung in einer kreisförmigen Maske wurde die Intensitätsverteilung in der Fokusebene berechnet (siehe Abbildung 5.1a). Diese Intensitätsverteilung liegt der Berechnung der dreidimensionalen Bestrahlungsmaske zugrunde. Da sich die im Objektraum kollimierten Laserstrahlen der strukturierten Beleuchtung unter den Winkeln α und $-\alpha$ zur z -Achse durchdringen, verlaufen diese X-förmig durch das Objektvolumen, wie in der Skizze 5.1b dargestellt. Aus der Gitterperiode des Beleuchtungsmusters g lässt sich ausgehend von der Gleichung der Intensität bei Zweistrahlinterferenz (4.2.5) dieser Winkel nach

$$\alpha = \text{asin} \left(\frac{\lambda_{ex}}{2ng} \right) \quad (5.14)$$

berechnen mit der Anregungswellenlänge λ_{ex} und dem Brechungsindex im Medium n . Die Gitterperiode g wird im Rahmen der SIM-Bildrekonstruktion mit hoher Genauigkeit

ermittelt und ist daher bekannt. Somit kann die dreidimensionale Intensitätsverteilung I_{lu_i} und damit die Bestrahlungsmaske w_i (Abbildung 5.2) nach Gleichung 5.5 für jede ROI berechnet werden. Mithilfe der individuellen Bestrahlungskarten und der Intensitätsverteilung der Fokusebene wird nach Gleichung 5.10 das Bildsignal in jeder ROI korrigiert.

Zusammenführung

Im letzten Schritt des Programms müssen alle Bereiche zu einer großen dreidimensionalen Aufnahme zusammengefügt werden.

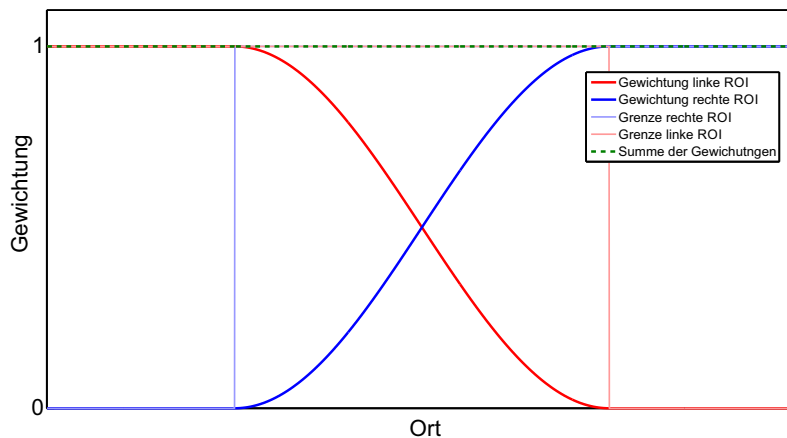


Abbildung 5.6: Im überlappenden Bereich zweier ROIs wird die Helligkeit beider ROIs über eine sinusoid gemischt.

Um zu verhindern, dass dadurch feine Kanten an den Grenzflächen aufgrund nicht perfekter Helligkeitskorrektur auftreten, werden im Überlappbereich die benachbarten ROIs gewichtet kombiniert. Hierzu wird eine Gewichtung in Form eines Sinusabschnittes wie in Abbildung 5.6 dargestellt verwendet.

Um den Zeitaufwand für das Gesamtprogramm zu reduzieren, kann optional für die Verschiebungsbestimmung und die Bestimmung der Bleichkonstanten ein unterabgetasteter Datensatz verwendet werden. Hierzu werden die einzelnen ROIs um einen Faktor von zwei in allen drei Raumrichtungen geschrumpft.

5.2 SIM-Rekonstruktion durch Pixelsortierung und iterative Entfaltung

5.2.1 Rückblick: Konventionelle Rekonstruktion

Die herkömmliche Rekonstruktion strukturiert beleuchteter Daten (siehe Kapitel 4.2.2) läuft über den Umweg des Fourierraums. Der Transfer vom Orts- in den Frequenzraum ermöglicht eine analytische Trennung der frequenzverschobenen Informationen des Bildes. Die auf diese Weise separierte Bildinformation kann im Fourierraum an ihre zugehörige Position geschoben werden, was nach anschließender Rücktransformation das hochauflösende SIM-Bild ergibt. Diese Rekonstruktion lässt sich entweder in 2D (Ebene für Ebene) oder direkt in 3D durchführen (siehe Grundlagen 4.2.2.1). Die Anwendung von geeigneten Frequenzfiltern, welche Information von außerhalb des Fokus unterdrücken, ermöglicht es hierbei, eine gute z -Separation (*optical sectioning*) zu erreichen. Die angewandte Frequenzfilterung stellt eine analytische Entfaltung, auch linearer inverser Filter genannt, dar.

Diese Art der Rekonstruktion ist bezüglich zweier Aspekte suboptimal:

1. Bei der Trennung und anschließenden gewichteten Rekombination der gegeneinander frequenzverschobenen Kopien der Bildinformation ist es nicht möglich, das Rauschen korrekt zu berücksichtigen. Während in den Rohbildern im Ortsraum das Rauschen der Poissonstatistik genügt und hiermit die Ungenauigkeit des Signals jedes Pixels proportional zur Wurzel seines Wertes ist, ist das Rauschen in der Fourier-Transformierten nicht vom Wert der Pixel abhängig. Hierdurch ist es unmöglich, die verschobenen Ordnungen im Frequenzraum gewichtet zu kombinieren und dabei die Objektabhängigkeit des Rauschen zu berücksichtigen.
2. In der Fluoreszenzmikroskopie kann vorausgesetzt werden, dass die Intensitätsverteilung in der Objektebene positiv ist. Im Rahmen eines linearen inversen Frequenzfilters kann diese Annahme nicht aufgenommen werden. Daher weisen die Ergebnisse in Bereichen mit geringem Signal eine Fluktuation um 0 auf.

Diese beiden Aspekte führen dazu, dass konventionell rekonstruierte SIM Bilder ein wesentlich stärkeres Bildrauschen aufweisen, als dies bei einem unbearbeiteten Weitfeldbild der Fall ist. Um die gesteigerte Rauschanfälligkeit mithilfe eines verstärkten Signals zu kompensieren, muss die Probe einer gesteigerten Lichtdosis ausgesetzt werden, was wiederum zu Limitationen der Anwendbarkeit von SIM führt. Um die SIM-Rekonstruktion durchführen zu können, sind für jede einzelne Fokusebene 9 beziehungsweise 15 Einzelbilder erforderlich (siehe Kapitel 4.2.2.1). Bei der Aufnahme von Strukturen, welche eine

große Tiefe besitzen, also entlang der optischen Achse weit ausgedehnt sind, führt die erforderliche Anzahl von mehreren hundert Einzelaufnahmen mit verhältnismäßig großer jeweiliger Lichtdosis in der Praxis unweigerlich zu Fluoreszenzbleichen. Dieses Fluoreszenzbleichen limitiert die maximal erreichbare Tiefe eines abzubildenden Volumens. Nicht nur bei der Untersuchung von tiefen fixierten Proben, sondern auch bei der Untersuchung von lebenden Proben stellt die notwendige hohe Lichtdosis ein Problem dar, da hierdurch die Probe beeinflusst beziehungsweise geschädigt wird.

5.2.2 Maximum-Likelihood-Entfaltung bei SIM

Es gibt neue Arbeiten von anderen Gruppen [71, 72], die von der Möglichkeit der Verwendung von entfaltungsbasierten, iterativen Algorithmen zur Rekonstruktion von strukturiert beleuchteten Daten handeln. Die hierbei zum Tragen kommende naheliegende Herangehensweise ist es, die strukturierte Beleuchtung in das Bildgebungsmodell zu integrieren. In jedem Iterationsschritt wird der Einfluss des strukturierten Beleuchtungsmusters simuliert. Hierzu wird in der Vorwärtssimulation jeweils das Modell mit der Beleuchtung multipliziert, bevor es mit der PSF gefaltet wird. Per Definition erhält man durch dieses Vorgehen die wahrscheinlichste ursächliche Fluorophorverteilung für das detektierte Bild. In beiden Publikationen wird dabei das Beleuchtungsmuster selbst im Rahmen der Entfaltung bestimmt bzw. optimiert. Während einmal ein verzerrtes periodisches Muster angenommen wird [72], wird in der anderen Publikation [71] gezeigt, dass es auch bei einer zufälligen (*speckle*) Beleuchtung möglich ist, das Objekts zu rekonstruieren unter der Annahme, dass die Summe aller angewandten Beleuchtungsmuster räumlich konstant ist. Die Entfaltungen wurden offenbar lediglich unter Verwendung zweidimensionaler Modelle durchgeführt. Die Zweidimensionalität der publizierten Daten hat vermutlich den Hintergrund, dass in der strukturierten Beleuchtung das Muster in der Richtung der optischen Achse (z) sich konfokal mit der gerasterten Fokustiefe mitbewegt („mitfahrendes Beleuchtungsmuster“ 4.2.1.3). Für eine Rekonstruktion solcher Daten ist es notwendig, die z -Abhängigkeit der Beleuchtung in die PSF zu integrieren, wie dies bei der frequenzraum-basierten SIM-Rekonstruktion Usus ist. Die Modelle müssten hierfür angepasst werden, um auch dreidimensionale Aufnahmen zu rekonstruieren.

Abweichend von dem beschriebenen Ansatz, die Beleuchtung in die Vorwärtssimulation der Entfaltung zu integrieren, lässt sich jedoch ein alternativer Ansatz finden, welcher durch eine geeignete Sortierung der Bildinformation in der Lage ist, das Beleuchtungsmuster direkt mit der PSF zu kombinieren (in allen Raumrichtungen), anstatt es vor der Faltung mit der PSF auf das Objekt anzuwenden. Aus Gesichtspunkten der Datenverarbeitung wird es hierdurch möglich, die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung als Konfokalmikroskopie aufzufassen.

In der konfokalen Bildgebung ergibt sich die resultierende PSF durch die bauartbedingte Begebenheit, dass der Detektor immer der Position des Beleuchtungsfleckes folgt. Dadurch, dass die resultierende PSF kleiner als die reine Detektions-PSF ist, verfügt das aufgenommene Bild ohne jede mathematische Nachbearbeitung über eine im Vergleich zur herkömmlichen Mikroskopie erhöhte Auflösung (siehe Abb. 4.7). Als optionaler Schritt zur Bildverbesserung kann im Folgenden eine iterative Entfaltung angewandt werden, um das wahrscheinlichste Objekt zu ermitteln.

5.2.3 Auffassung von SIM als Konfokalmikroskopie

Paul Lemmer [73] führte erste Experimente durch, die zeigten, dass es möglich ist, alleine durch ein Scannen der Probe über das Beleuchtungsmuster der strukturierten Beleuchtung, eine Auflösungsverbesserung zu erreichen (siehe Abb. 5.7). In diesen Experimenten wurde die Probe mit einem fixen Gitter mit Modulation in y -Richtung beleuchtet, währenddessen in feinen Schritten entlang der y -Richtung bewegt und dabei jeweils aufgenommen. Anschließend wurde eine Pixelreihe parallel zur x -Achse betrachtet, welche zentral entlang eines Maximums der periodischen Beleuchtung lag. Dieses zunächst räumlich eindimensionale Signal wurde anschließend um die Dimension der zu x orthogonalen Verschiebung y_s der Probe erweitert dargestellt. Es wurde bei diesem Vorgehen also eine Zeilenraasterung durchgeführt, wie es z.B. in einem Dokumentenscanner der Fall ist.

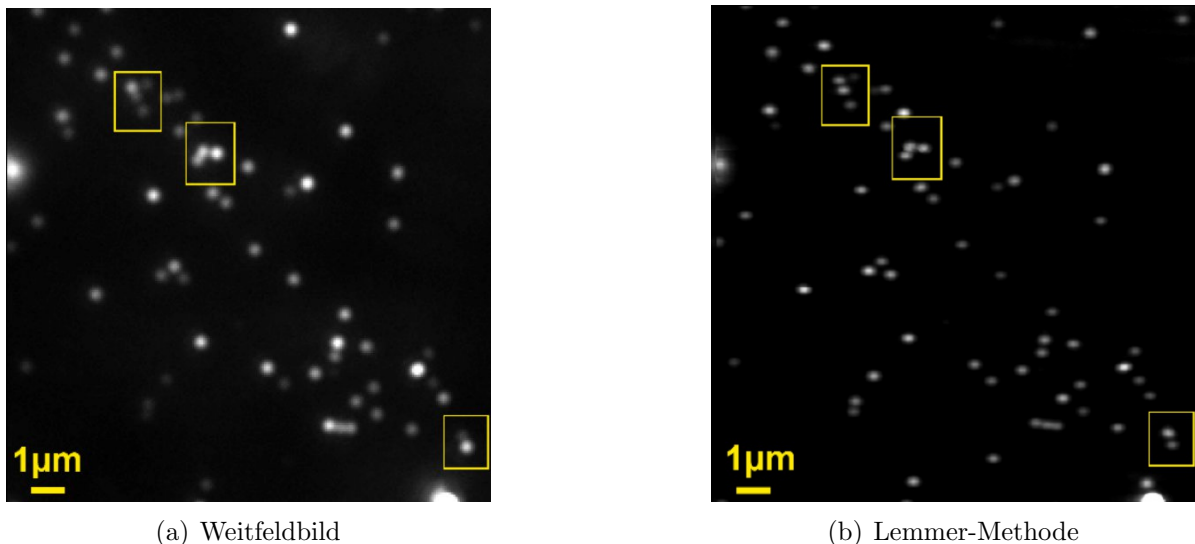


Abbildung 5.7: Ergebnis der Lemmer'schen Methode an fluoreszierenden Nanopartikel mit einem Durchmesser von 100 nm . Quelle: Doktorarbeit Paul Lemmer [73]

Man erhält durch das Scannen der Probe über das feste Beleuchtungsmuster entlang einer Pixelreihe, welche auf dem Maximum des Beleuchtungsmusters liegt, das von der Konfokalmikroskopie bekannte Ergebnis: Die Beleuchtung wirkt multiplikativ auf die PSF.

Die resultierende PSF h_{res} ist entlang der Modulationsrichtung der Beleuchtung schmäler als die Detektions-PSF (siehe Abbildung 5.8), die Auflösungsfähigkeit entlang dieser Richtung übertrifft also die konventionelle Auflösungsgrenze. Die Auflösungsverbesserung ergibt sich hier ohne die Notwendigkeit zur mathematischen Bildbearbeitung und insbesondere ohne die Notwendigkeit, in den Frequenzraum zu transformieren.

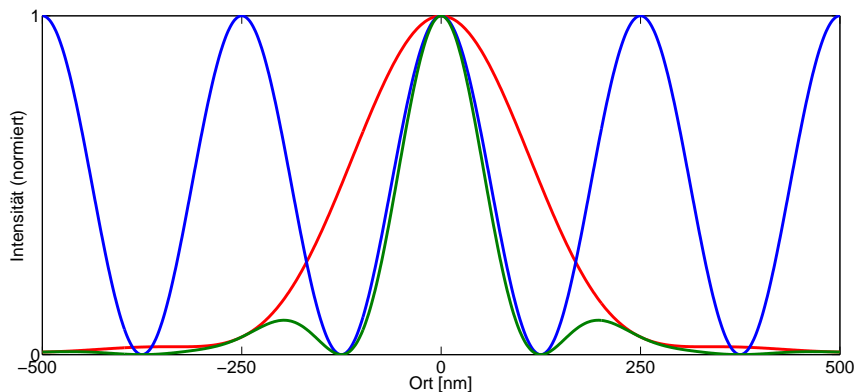


Abbildung 5.8: Die resultierende PSF (grün) ist das Produkt aus Beleuchtungsmuster (blau) und Detektions-PSF (rot).

5.2.4 SIM-Rekonstruktion mit Hilfe geeigneter Pixel-Sortierung

Die von Paul Lemmer entwickelte Methode hatte noch den entscheidenden Nachteil, dass nur die Pixel entlang eines Maximums der Beleuchtung verwendet wurden. Die periodische Natur des Beleuchtungsmusters hätte es zwar ermöglicht, die Datenaufnahme zu parallelisieren, indem mehrere Pixelreihen mit jeweils dem Abstand einer Gitterperiode aufgezeichnet worden wären, jedoch wäre auch in diesem Fall der Großteil der Bildinformation, welcher auf den restlichen Pixeln lag, verloren gewesen. Die Verschwendung von Bildinformation hätte daher zu einem sehr geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis geführt. Daher wurde diese Methode lediglich an fluoreszierenden Nanopartikeln ausprobiert und nicht weiter verfolgt (siehe Abbildung 5.7).

Die prinzipielle Idee der Auffassung von SIM als Rasterungsmikroskopiemethode legte allerdings den Grundstein für die im folgenden beschriebene Pixel-Sortierung und Entfaltung von SIM-Daten.

Die Besonderheit, dass durch dieses Aufnahmeverfahren die Beleuchtung verschiebungsinvariant ist und daher zusammen mit der Detektions-PSF eine resultierende PSF ergibt, ermöglicht es nämlich, einen Entfaltungsalgorithmus für verschiedene Aufnahmen eines Objekts (*multi-view-deconvolution*) auf das Ergebnisbild mit seiner resultierenden PSF anzuwenden. Hierdurch ist es möglich, die Information jedes Pixels, also auch der Pixel, auf denen z.B. die Beleuchtungsintensität minimal ist, in die Bestimmung der wahrscheinlichsten Fluorophorverteilung einfließen zu lassen.

In der Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung wird in der Regel nicht – wie es in den Experimenten Paul Lemmers der Fall war – das Objekt gerastert, sondern das Beleuchtungsmuster. Herkömmliche, auf diese Weise erzeugte, SIM-Aufnahmen müssen also in eine ähnliche Form gebracht werden, wie die Daten, welche Paul Lemmer für die line-scanning-SIM-Rekonstruktion verwendete, um dieses alternative Rekonstruktionsverfahren anwenden zu können. Die naheliegendste Lösung, die einzelnen Phasenbilder jeweils subpixelgenau um die inverse Verschiebung des Musters zu versetzen, ist ungeeignet. Zum einen wird bei einer subpixelgenauen Verschiebung der Fehler (die statistische Schwankung) des Intensitätsmesswertes der einzelnen Pixel verfälscht, zum anderen wäre es hierbei schwierig, die Periodizität des Beleuchtungsmusters korrekt zu berücksichtigen, ohne für jede eingestellte Ausrichtung des Beleuchtungsmusters die Pixelgröße (Samplingfrequenz) anzupassen.

Daher wird die Zuweisung der Pixel zu ihrer PSF nicht in einer Ortsdimension, sondern in der Beleuchtungsmuster-Phasendimension vorgenommen.

Für gewöhnlich besitzt das Beleuchtungsmuster bei SIM potentiell eine Modulation entlang der z -Achse (bei Dreistrahlinterferenz) und zusätzlich eine Modulation entlang einer Geraden auf der Fokusebene (x - y -Ebene). Hiermit sind die gebräuchlichen Beleuchtungsmuster also lediglich zweidimensional. Die folgende Herleitung ist für beliebige solcher Beleuchtungsmuster (Zwei- und Dreistrahlinterferenz eingeschlossen) gültig.

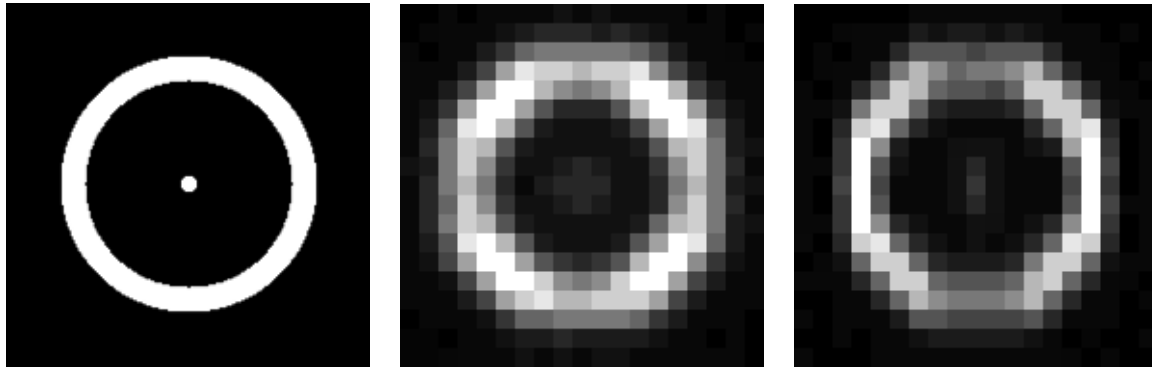
Ohne Einschränkung der Allgemeinheit wird angenommen, dass die Gittervektoren, welche zur z -Achse orthogonal sind, auf der x -Achse liegen, womit alle Gittervektoren orthogonal zur y -Achse sind.

Während der SIM-Aufnahme wird dieses Beleuchtungsmuster entlang der x -Achse auf verschiedene Positionen x_s geschoben während die Objektposition fix ist. Die Rasterung entlang der z -Richtung geschieht durch Verfahren des Objektivs oder der Probe, womit der Fall des entlang z mitfahrenden Beleuchtungsmusters gegeben ist (siehe Abschnitt 4.2.1.3). Das Beleuchtungsmuster verschiebt sich somit analog zur Fokusebene und ist daher in der z -Richtung konfokal. Wird die Fokusebene auf die z -Position z_s eingestellt, verschiebt sich die Beleuchtung auch auf diese Tiefe z_s . Für ein Bild der Ebene bei $z = z_s$ erhält man somit die Beleuchtung

$$Illu_s(x, z) = Illu_0(x - x_s, z - z_s) . \quad (5.15)$$

Der Index s der Beleuchtung zeigt die Verschiebung x_s in x -Richtung und die Verschiebung in der Tiefe z_s an.

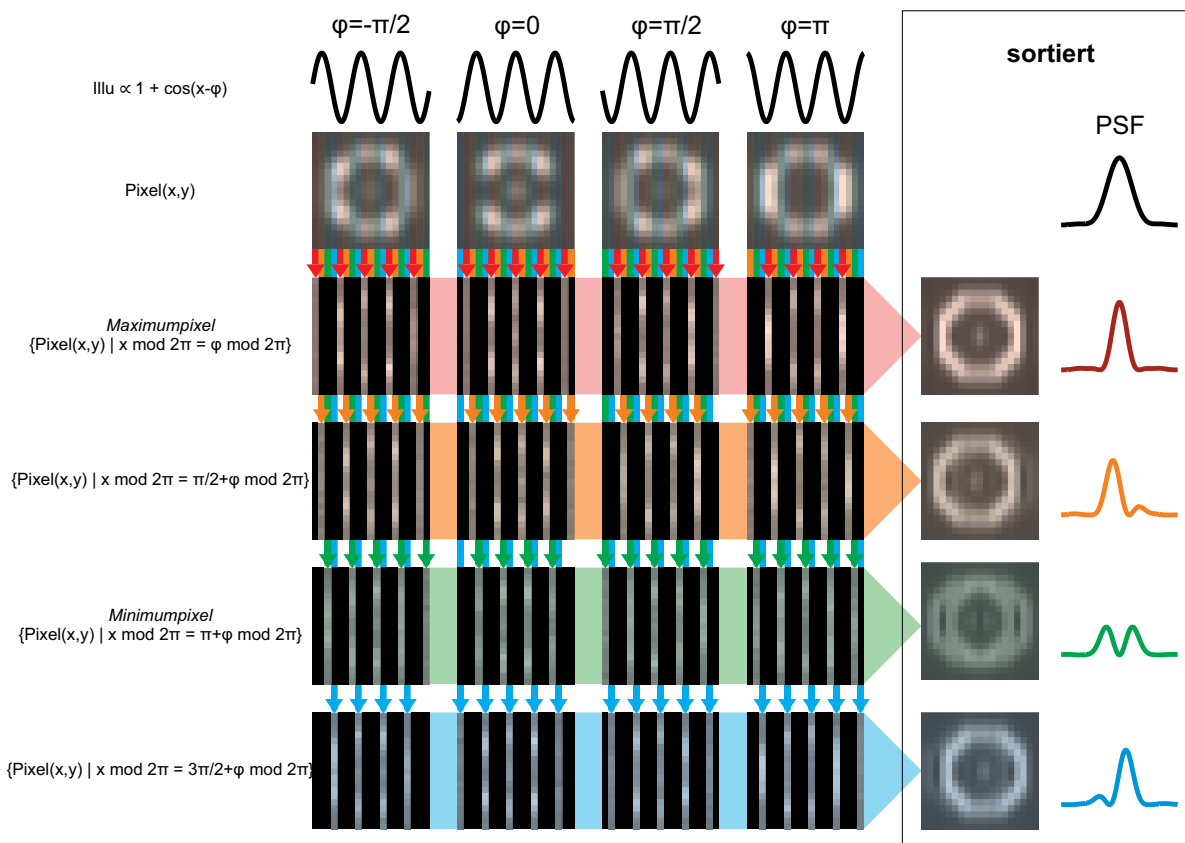
Die Intensitätsverteilung in der Bildebene ist hiermit durch die Bildgebungsgleichung



(a) Objekt

(b) Weitfeldbild

(c) Maximumpixelbild



(d) Sortierverfahren

Abbildung 5.9: Sortierverfahren für die strukturiert beleuchteten Aufnahmen. Als Objekt für die Simulation wurde ein Ring mit Punkt in der Mitte verwendet. Das aus den Maximumpixeln erstellte Bild hat entlang der Modulationsrichtung der Beleuchtung eine erhöhte Auflösung.

$$I_s(x, y, z) = [\rho(x, y, z) \cdot Illu_s(x, z)] * h(x, y, z) \quad (5.16)$$

gegeben.

Um im Folgenden die Pixelsortierung zu beschreiben wird jeweils nur eine Linie von Pixeln, welche entlang der y -Richtung positioniert sind, betrachtet. Mathematisch wird hierzu die folgende Pixelselektionsfunktion PS_s verwendet.

$$PS_s(x, y) = \delta(x - x_s)\delta(z - z_s) \quad (5.17)$$

Hiermit erfahren die betrachteten Pixel die selbe Verschiebung wie das Beleuchtungsmuster. Zur Vereinfachung werden die Pixel hierbei offensichtlich als punktförmig angenommen.

Nun wird angenommen, dass das Objektvolumen durch zweidimensionale Rasterung der Beleuchtung und der aufgezeichneten Pixel auf verschiedene Orte (x_s, z_s) aufgezeichnet wird. Es werden also immer die entsprechenden Pixelreihen in ein dreidimensionales Bild eingetragen. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass diese Rasterung kontinuierlich ist, womit die Summe über alle Pixelreihen zu einem Integral wird.

$$I_{res}(x_s, y, z_s) = \iint dx dz ([\rho(x, y, z) \cdot Illu_s(x, z)] * h(x, y, z)) \cdot PS_s(x, z) \quad (5.18)$$

Ein Ausschreiben des Faltungsintegrals gibt

$$I_{res}(x_s, y, z_s) = \iint dx dz \iiint dx' dy' dz' \rho(x', y', z') \cdot Illu_s(x', z') \quad (5.19)$$

$$\cdot h(x - x', y - y', z - z') \cdot PS_s(x, z) . \quad (5.20)$$

Die konstanten Terme können aus den Integralen über x und y gezogen werden. Außerdem werden die Ausdrücke für $Illu_s$ (5.15) und PS_s (5.17) eingesetzt.

$$I_{res}(x_s, y, z_s) = \iiint dx' dy' dz' \rho(x', y', z') \cdot Illu_0(x' - x_s, z' - z_s) \quad (5.21)$$

$$\begin{aligned} & \cdot \iint dx dz h'(x' - x, y - y', z' - z) \cdot \delta(x - x_s) \delta(z - z_s) \\ & = \iiint dx' dy' dz' \rho(x', y', z') \cdot Illu'_0(x_s - x', z_s - z') \quad (5.22) \\ & \cdot h(x_s - x', y - y', z_s - z') \end{aligned}$$

$Illu'$ bezeichnet die Beleuchtung gespiegelt in x - und z -Richtung. Hiermit drückt das resultierende Integral wiederum eine Faltung aus.

$$I_{res}(x_s, y, z_s) = (\rho * [Illu'_0 \cdot h]) (x_s, y, z_s) \quad (5.23)$$

$$= (\rho * h_{res}) (x_s, y, z_s) \quad (5.24)$$

Offensichtlich ist es damit möglich, durch eine geeignete Wahl der Pixel, das (gespiegelte) Beleuchtungsmuster in die PSF zu integrieren, mit welcher das Objekt gefaltet wird.

Aufgrund der Periodizität des Beleuchtungsmusters ist es möglich, die Aufnahme der Pixellinien zu synchronisieren. Hierzu kann man nicht nur eine Pixellinie bei einer Beleuchtungsposition aufzuzeichnen, sondern gleichfalls alle Pixelreihen, welche die gleiche Beleuchtung erfahren. Hiermit wird nicht nur eine Linie von Pixeln auf einmal verwendet, sondern ein in der x - y -Ebene liegendes Gitter. Wenn die Periode der Beleuchtung entlang der x -Achse P beträgt, beträgt der Gitterabstand dieses Pixelgitters ebenfalls P . Bei dieser Betrachtung werden somit lediglich die Pixel aufgezeichnet, welche auf dem Ursprung des Beleuchtungsmusters bzw. auf einer hierzu redundanten Position liegen. Mit redundant ist gemeint, dass sich das Beleuchtungsmuster aufgrund seiner Periodizität für diese Pixel nicht unterscheidet. Die benachbarten Pixel, welche ein phasenverschobenes Beleuchtungsmuster erfahren, werden nicht verwendet. Es ist allerdings möglich, diese Pixelreihen, für welche das Beleuchtungsmuster eine andere Phase ϕ besitzt, ebenfalls in einem anderen Bild abzuspeichern.

Die resultierende synchrone Pixelselektionsfunktion ist durch

$$PS_{sync,s}(x, y, \phi_s) = \sum_{n=low}^{high} \delta(x - x_s + P [n + \phi_s/2\pi]) \delta(z - z_s) \quad (5.25)$$

gegeben. Die Summe geht über alle Pixel des Bildes n . Diese ist nun abhängig von der Phase ϕ , welche die auf den Pixeln liegende Beleuchtung besitzen soll. Durch die Synchron-

nisierung der Pixelselektionsfunktion zu $PS_{sync,s}$ genügt es nun, das Beleuchtungsmuster lediglich über eine Periode zu rastern, um ein geschlossenes Bild in der x - y -Ebene aufzuzeichnen. Durch Änderung der Selektionsphase ϕ_s können die Pixelreihen, welche ein verschobenes Beleuchtungsmuster erfahren, zu einem Bild zusammengesetzt werden. Die resultierende PSF h_{res} ist durch

$$h_{res}(x, y, z, \phi_s) = h(x, y, z) \cdot Illu'_0(x + \phi_s, z) \quad (5.26)$$

gegeben. Dieser Vorgang der Pixelsortierung ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Um aus den sortierten Bildern ein hochauflösendes Bild der Objektverteilung zu erzeugen, können im Folgenden diese Bilder zusammen mit ihren resultierenden PSFs einem *maximum likelihood*-basierten multi-PSF-Entfaltungsalgorithmus übergeben werden. Die Entfaltung resultiert dann in der wahrscheinlichsten Objektverteilung ρ_{recon} .

Die bisherige mathematische Herleitung, welche den kontinuierlichen Fall behandelte, und die auf simulierten Daten beruhende Abbildung 5.9 basieren darauf, dass die Rasterungspositionen x_s immer genau auf den Pixelorten liegen. In der Praxis ist eine solche Realisierung des Experiments an einem echten Mikroskop allerdings nicht möglich. Es würde hier für jedes Pixel eine Abweichung von der gewünschten Beleuchtungsphase geben, weswegen die Pixelselektionsfunktion (5.25) in der Praxis für den Ort jedes Pixels 0 wäre. Diesem Problem kann damit begegnet werden, dass ein gewisser Fehler der Beleuchtungsphase akzeptiert wird und somit Pixel zu einem Bild zusammengefügt werden, welchen nicht die identische Beleuchtung zugrunde liegt. Aufgrund der periodischen Natur des Beleuchtungsmusters ist diese Abweichung allerdings nicht zufällig über den Ort verteilt, sondern periodisch. Hiermit führen sogar kleine Abweichungen der Phase im sortierten Bild zu sichtbaren periodischen Artefakten.

5.2.5 Pixel-Sortierung mit Phaseninterpolierung

Aus diesem Grund wird eine Interpolierung der Pixel der Bilder nicht in der Orts- sondern in der Beleuchtungsmuster-Phasendimension vorgenommen, um damit sortierte Bilder zu erzeugen, in denen jedem Pixel die identische PSF h_{res} zugrunde liegt. Hierzu sollen die verfügbaren Bilder pixelweise linear kombiniert werden. Der Ausgangspunkt der Herleitung dieses Verfahrens liegt in dem Versuch, für ein Pixel mit dem Index i , welches mit dem Beleuchtungsmuster bei verschiedenen Phasen ϕ_n aufgezeichnet wurde, die Bilder mit den verschiedenen Phasen so zu kombinieren, dass das Beleuchtungsmuster der Linearkombination einem bestimmten gewünschten resultierenden Muster $Illu_{ref,i}$ entspricht.

Das (beliebige) Beleuchtungsmuster ist periodisch und reell und kann somit durch eine reelle Fouriersumme dargestellt werden

$$Illu_0(\mathbf{r}) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^m A_n \cos(\mathbf{k}_n \mathbf{r} - \phi_n) \quad (5.27)$$

mit einer begrenzten Anzahl von $m + 1$ Elementen und $a_0, A_n, \phi_n \in \mathbb{R}$. Hierbei wird die Amplituden und Phasennotation der Fourierdarstellung statt der gebräuchlicheren komplexen Darstellung gewählt, da hiermit die Reellwertigkeit der Beleuchtung impliziert ist. Wie bereits bei der Herleitung der Bildgebung durch Pixelselektion bei SIM (5.2.4), wird hier wieder vorausgesetzt, dass das Gitter zweidimensional ist. Hierzu wird wieder ohne Einschränkung der Allgemeinheit vorausgesetzt, dass die Wellenvektoren senkrecht zur y -Achse sind.

$$\mathbf{k}_n \perp \mathbf{u}_y \quad \forall n \in \mathbb{N}$$

Während der Aufnahme wird dieses Beleuchtungsmuster auf verschiedene Positionen durch den Verschiebungsvektor $\mathbf{r}_s = (x_s, 0, z_s)$ geschoben.

$$Illu_s(\mathbf{r}) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^m A_n \cos(\mathbf{k}_n [\mathbf{r} - \mathbf{r}_s] - \phi_n) \quad (5.28)$$

Mithilfe des Winkelsummentheorems des Kosinus können periodische und konstante Terme getrennt werden.

$$Illu_s(\mathbf{r}) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^m \underbrace{A_n \cos(\mathbf{k}_n \mathbf{r}_s + \phi_n)}_{a_n} \cdot \cos(\mathbf{k}_n \mathbf{r}) + \underbrace{A_n \sin(\mathbf{k}_n \mathbf{r}_s + \phi_n)}_{b_n} \cdot \sin(\mathbf{k}_n \mathbf{r}) \quad (5.29)$$

Hiermit ist in Gleichung 5.29 das verschobene Beleuchtungsmuster in der Fourier-Sinus und Kosinussnotation dargestellt mit den Fourierkoeffizienten a_n und b_n . Bei gegebenen Wellenvektoren \mathbf{k}_n beschreiben diese Koeffizienten das Beleuchtungsmuster vollständig. Die Pixel der Kamera befinden sich auf diskreten Orten \mathbf{r}_p , welche nicht mit \mathbf{r}_s übereinstimmen. Aus den aufgezeichneten Bildern der Kamera mit den verschobenen Beleuchtungsmustern (Index s) soll nun für jedes Pixel an einem Ort eine Linearkombination mit den Gewichtungen $w_{s,i}$ angefertigt werden, sodass das dem Pixel zugrunde liegende Beleuchtungsmuster dem gewünschten Referenzmuster $Illu_{ref,i}$ entspricht, welches auf die Pixelposition \mathbf{r}_p geschoben ist.

$$Illu_i(\mathbf{r}) = Illu_{ref,i}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_p) \stackrel{!}{=} \sum_{s=1}^l w_{s,i} Illu_s(\mathbf{r}) . \quad (5.30)$$

Der Index i wurde eingeführt, um die Wahl unterschiedlicher Referenzmuster zu ermöglichen und somit zusätzlich zur Position des Musters weitere Freiheitsgrade zur Verfügung zu stellen.

Diese Gleichung 5.30 gilt analog für die Bildintensität. Dies kann gezeigt werden, indem man die Bilderzeugung (Multiplikation mit ρ und anschließend Faltung mit h) auf die Linearkombinationsgleichung anwendet:

$$[\rho(\mathbf{r}) \cdot Illu_i(\mathbf{r})] * h(\mathbf{r}) \stackrel{!}{=} \left[\rho(\mathbf{r}) \cdot \left(\sum_{s=1}^l w_{s,i} Illu_s(\mathbf{r}) \right) \right] * h(\mathbf{r}) \quad (5.31)$$

Da sowohl Multiplikation, als auch Faltung distributiv zur Addition sind, lässt sich die Summe in die Bilderzeugung ziehen.

$$[\rho(\mathbf{r}) \cdot Illu_i(\mathbf{r})] * h(\mathbf{r}) \stackrel{!}{=} \sum_{s=1}^l w_{s,i} [\rho(\mathbf{r}) \cdot Illu_s(\mathbf{r})] * h(\mathbf{r}) \quad (5.32)$$

$$I_i(\mathbf{r}) \stackrel{!}{=} \sum_{s=1}^l w_{s,i} I_s(\mathbf{r}) . \quad (5.33)$$

Gleichungen 5.30 und 5.33 sind erfüllt, wenn alle Fourierkoeffizienten des linearkombinierten Musters und des Referenzmusters übereinstimmen.

Für die Kosinuskoeffizienten gilt somit

$$a_{n,i} \stackrel{!}{=} \sum_{s=1}^l w_{s,i} a_{n,s} \quad (5.34)$$

$$A_{ref,n,i} \cos(\mathbf{k}_n \mathbf{r}_p + \phi_n) \stackrel{!}{=} \sum_{s=1}^l w_{s,i} A_n \cos(\mathbf{k}_n \mathbf{r}_s + \phi_n) . \quad (5.35)$$

Für die Sinuskoeffizienten gilt die analoge Bedingung. Die Voraussetzungen aller Fourierkoeffizienten ergeben das folgende lineare Gleichungssystem:

$$\underbrace{\begin{pmatrix} a_{0,1} & \dots & a_{0,l} \\ \vdots & & \vdots \\ a_{m,1} & \dots & a_{m,l} \\ b_{1,1} & \dots & b_{1,l} \\ \vdots & & \vdots \\ b_{m,1} & \dots & b_{m,l} \end{pmatrix}}_{\mathbf{M}} \cdot \underbrace{\begin{pmatrix} w_{1,i} \\ \vdots \\ w_{l,i} \end{pmatrix}}_{\mathbf{w}_i} = \underbrace{\begin{pmatrix} a_{0,p} \\ \vdots \\ a_{m,p} \\ b_{1,p} \\ \vdots \\ b_{m,p} \end{pmatrix}}_{\mathbf{c}_i} \quad (5.36)$$

Wenn die Anzahl der Bilder bei verschiedenen (nicht-redundanten) Beleuchtungsmusterpositionen gleich der Anzahl der Fourierkoeffizienten ist (für Zweistrahlinterferenz: 3, für Dreistrahlinterferenz: 5), lässt sich das Gleichungssystem eindeutig lösen. Für die Gewichtungen gilt:

$$\mathbf{w}_i = \mathbf{M}^{-1} \mathbf{c}_i \quad (5.37)$$

In der Praxis kann die Invertierung von \mathbf{M} effizient durch die Anwendung von Arrayoperationen auf dem gesamten Bild als Ganzes durchgeführt werden, anstatt die Matrix Pixel für Pixel zu invertieren. Hiermit kann nun für jedes Pixel ein resultierendes Beleuchtungsmuster $Illu_{ref,i}$ mit beliebiger zugrundeliegender Phase linearkombiniert werden.

Es ist anzumerken, dass durch die beschriebene Linearkombination nicht nur die Phase des resultierenden Musters variiert werden kann, sondern auch die Amplituden der einzelnen periodischen Elemente des Musters. Prinzipiell ist es hiermit also möglich, die hochauflösenden Kopien des Bildes im Ortsraum zu separieren ohne die Notwendigkeit in den Ortsfrequenzraum zu transformieren.

Für die entfaltungsbasierte Rekonstruktion wurde dies jedoch nicht getan, sondern es wurden lediglich resultierende Beleuchtungen mit einer Anzahl von t äquidistanten Phasenpositionen berechnet. Für den Fall der Dreistrahlinterferenz wurden sortierte Bilder mit der Beleuchtung $Illu_{ref,i}$ bei $\phi_i = 0, \frac{2\pi}{3}, \frac{4\pi}{3}$ berechnet.

Aus den Gewichtungen lässt sich nun die Sortiermatrix

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} w_{1,1} & w_{2,1} & \dots & w_{l,1} \\ w_{1,2} & w_{2,2} & \dots & w_{l,2} \\ \vdots & & & \vdots \\ w_{1,j} & w_{2,j} & \dots & w_{l,j} \end{pmatrix} \quad (5.38)$$

aufstellen, mit welcher sich das Bild Pixel für Pixel in die sortierte Form $\mathbf{I}_{\text{sortiert}} = (I_1, I_2, ..I_j)$ linearkombinieren lässt.

$$\mathbf{I}_{\text{sort}} = \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}_{\text{mess}} \quad (5.39)$$

Wohlgemerkt stellt die Vektornotation hier nicht alle Bildpunkte des Bildes mit linearem Index dar, sondern das Ensemble von Messpunkten an einem Ort bei verschiedenen Positionen bzw. Phasen des Beleuchtungsmusters einmal in der originären (\mathbf{I}_{mess}) und einmal in der sortierten Form (\mathbf{I}_{sort}) dar. Auf einen weiteren Index zur Kennzeichnung des Ortes wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Wenn die Anzahl der gemessenen und der sortierten Bilder identisch ist ($j = l$), ist die Interpolierungsmatrix \mathbf{A} invertierbar. Somit lassen sich in diesem Fall die Bilder beliebig sortieren und verlustfrei wieder in die unsortierte Form rücktransformieren, was für die Entfaltung von Bedeutung ist.

5.2.6 Entfaltung der sortierten Daten

5.2.6.1 Likelihoodfunktion

Der Wert $I_{\text{mess},s}$ stellt den Erwartungswert der Intensität dar, welche durch ein Pixel am Ort \mathbf{r} gemessen wird, wenn die Beleuchtung auf den durch den Index s gekennzeichneten Ort positioniert ist. Der Messwert $b_{\text{mess},s}$ dieser Intensität unterliegt jedoch der Poissonverteilung aufgrund der Quantenstatistik der detektierten Photonen.

Für die Entfaltung des sortierten Bildstapels mit den resultierenden PSFs muss die Likelihoodfunktion für die geschätzten Erwartungswerte der einzelnen Pixel berechnet werden. Der Weg über den herkömmliche Ansatz, hierfür von den der Wahrscheinlichkeitsverteilung von den Pixeln in den sortierten Bildern $P(b_{\text{sort},t})$ auszugehen, gestaltet sich sehr schwierig, da durch die Erzeugung der sortierten Pixel als Linearkombination der Messwerte, die sortierten Pixel an dem selben Ort ($b_{\text{sort},1} \dots b_{\text{sort},j}$) voneinander abhängen und sich daher die kombinierte Wahrscheinlichkeit nicht als Produkt berechnet.

$$P(b_{\text{sort},1} \cap b_{\text{sort},2} \cap \dots \cap b_{\text{sort},j}) \neq P(b_{\text{sort},1})P(b_{\text{sort},2}) \cdot \dots \cdot P(b_{\text{sort},j}) \quad (5.40)$$

Aus diesem Grund wird als Ausgang für die Likelihoodfunktion die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Kombination von Pixeln an einem Ort im gemessenen Datenstapel verwendet:

$$P(b_{\text{mess},1} \cap \dots \cap b_{\text{mess},l}) = P(\mathbf{b}_{\text{mess}}) \quad (5.41)$$

Die Kombination aus mehreren Messpunkten an einem Ort bei unterschiedlicher Beleuchtung wird als Vektor \mathbf{b}_{mess} ausgedrückt. Die Komponenten $b_{\text{mess},s}$ sind jeweils Poisson-

verteilt mit $\lambda_s = I_{\text{mess},s}$ und ihre Wahrscheinlichkeiten sind unabhängig, weswegen ihre kombinierte Wahrscheinlichkeit dem Produkt entspricht.

$$\begin{aligned} P(\mathbf{b}_{\text{mess}}) &= \prod_s P(b_{\text{mess},s}) \\ &= \prod_s \frac{I_{\text{mess},s}^{b_{\text{mess},s}}}{b_{\text{mess},s}!} e^{-I_{\text{mess},s}} \end{aligned} \quad (5.42)$$

In dieser Wahrscheinlichkeitsfunktion sollen nun die Erwartungswerte \mathbf{I}_{mess} durch \mathbf{I}_{sort} ersetzt werden. Dies kann durch Anwendung der Sortiermatrix \mathbf{A} auf \mathbf{I}_{mess} durchgeführt werden.

Wenn die Anzahl der Elemente von \mathbf{I}_{mess} gleich der von \mathbf{I}_{sort} ist und damit die Sortiermatrix quadratisch ist, gilt

$$\mathbf{I}_{\text{sort}} = \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}_{\text{mess}} \quad (5.43)$$

$$\mathbf{I}_{\text{mess}} = \mathbf{A}^{-1} \cdot \mathbf{I}_{\text{sort}} \quad (5.44)$$

Die Wahrscheinlichkeitsfunktion (5.42) nach Substitution der Elemente von \mathbf{I}_{mess} durch die Elemente von \mathbf{I}_{sort} , ergibt:

$$P(\mathbf{b}_{\text{mess}}) = \prod_s \frac{(\mathbf{A}^{-1} \mathbf{I}_{\text{sort}} \mathbf{e}_s)^{b_{\text{mess},s}}}{b_{\text{mess},s}!} \exp(-\mathbf{A}^{-1} \mathbf{I}_{\text{sort}} \mathbf{e}_s) \quad (5.45)$$

Der Einheitsvektor \mathbf{e}_s wird hier verwendet, um jeweils den strukturiert beleuchteten Erwartungswert $I_{\text{mess},s}$ aus dem Vektor der Erwartungswerte des Pixels bei allen verschiedenen Beleuchtungen \mathbf{I}_{mess} zu extrahieren, welcher sich wiederum nach 5.44 aus der Anwendung der invertierten Sortiermatrix \mathbf{A}^{-1} auf \mathbf{I}_{sort} ergibt.

Die Wahrscheinlichkeitsfunktion $P(\mathbf{b}_{\text{sort}})$ (5.45) gibt nun die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Wertekombination bei einer gegebenen Kombination von sortierten Erwartungswerten \mathbf{I}_{sort} an. Wenn nun die Messwerte \mathbf{b}_{sort} als gegeben angesehen werden und man P als Funktion einer veränderlichen Erwartungswertekombination ansieht, geht diese Wahrscheinlichkeitsfunktion in die Likelihoodfunktion $L(\mathbf{I}_{\text{sort}})$ über. Es handelt sich hierbei also prinzipiell um dieselbe Funktion, welche lediglich aufgrund der Annahme einer anderen Veränderlichen anders bezeichnet wird.

$$P(\mathbf{b}_{\text{mess}} \text{ fest}, \mathbf{I}_{\text{sort}} \text{ variabel}) = L(\mathbf{I}_{\text{sort}}) \quad (5.46)$$

Das Ziel im Rahmen der iterativen optimierungsbasierten Entfaltung besteht darin, die Likelihoodfunktion zu maximieren und damit den wahrscheinlichsten Erwartungswert unter der Voraussetzung der Messwerte zu erhalten. Hierzu wird statt der Likelihoodfunktion die negative logarithmierte Likelihoodfunktion (neg-log-Likelihoodfunktion) l verwendet. Da der Logarithmus streng monoton steigend ist, haben eine Funktion und ihr Logarithmus dieselben Extremwertstellen. Die neg-log-Likelihoodfunktion ist damit gegeben durch

$$\begin{aligned} l(\mathbf{I}_{\text{sort}}) &= -\ln[L(\mathbf{I}_{\text{sort}})] \\ &= \sum_s \ln(b_{\text{mess},s}!) - b_{\text{mess},s} \cdot \ln(\mathbf{A}^{-1}\mathbf{I}_{\text{sort}}\mathbf{e}_s) + \mathbf{A}^{-1}\mathbf{I}_{\text{sort}}\mathbf{e}_s \end{aligned} \quad (5.47)$$

Es ist außerdem möglich, durch die inverse Sortiermatrix \mathbf{A}^{-1} , die gemessenen unsortierten Pixelwerte ebenfalls durch die sortierten (linear kombinierten) Werte auszudrücken.

$$l(\mathbf{I}_{\text{sort}}) = \sum_s \ln(\mathbf{A}^{-1}\mathbf{b}_{\text{sort}}\mathbf{e}_s!) - \mathbf{A}^{-1}\mathbf{b}_{\text{sort}}\mathbf{e}_s \ln(\mathbf{A}^{-1}\mathbf{I}_{\text{sort}}\mathbf{e}_s) + \mathbf{A}^{-1}\mathbf{I}_{\text{sort}}\mathbf{e}_s \quad (5.48)$$

(5.48) lässt sich nicht weiter nach den Elementen von \mathbf{I}_{sort} , also nach $I_{\text{sort},1}$, $I_{\text{sort},2}$ etc. separieren. Dies trägt der Tatsache Rechnung, dass durch die Interpolierung der Daten nachdem der statistische Prozess stattgefunden hat die Einzelwahrscheinlichkeiten der sortierten Messwerte $b_{\text{sort},i}$ sich einander bedingen.

Die bis jetzt berechnete Likelihoodfunktion gilt jeweils nur für die Wertekombination \mathbf{I}_{sort} an einem Ort. Um nun alle Pixel der Aufnahme zu betrachten, wird der Index j für die Pixelpositionen $\mathbf{r}_j = (x_j, y_j, z_j)$ eingeführt.

Ein sortiertes Bild S als Gesamtheit seiner Pixel stellt eine Menge aus m (Anzahl der Pixel) Pixeltupeln $\mathbf{b}_{\text{mess},j}$ dar.

$$S = \{\mathbf{b}_{\text{mess},1}, \mathbf{b}_{\text{mess},2}, \dots, \mathbf{b}_{\text{mess},m}\} \quad (5.49)$$

Die Wahrscheinlichkeiten für Werte an verschiedenen Orten im Bild bedingen sich nicht, weswegen sich die kombinierte Wahrscheinlichkeit bzw. Likelihood für das Gesamtbild aus dem Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten ergibt.

$$L(S) = \prod_{j=1}^m L(\mathbf{I}_{\text{mess},j}) \quad (5.50)$$

Für die neg-log-Likelihood wird das Produkt zur Summe:

$$l(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^m l(\mathbf{I}_{\text{mess},j}) \quad (5.51)$$

↓

$$l(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^m \sum_{s=1}^n -\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{b}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s \ln [\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{I}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s] \\ + \mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{I}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s + \ln(\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{b}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s!) \quad (5.52)$$

Für die ausgeschriebene neg-log-Likelihoodfunktion (5.52) wurden lediglich die Einzelwahrscheinlichkeit (5.48) in 5.51 eingesetzt.

Die Likelihoodfunktion zeigt nun an, wie gut eine sortierte Intensitätsverteilung die gemessenen Werte widerspiegelt. Das Ziel ist es aber nicht, die wahrscheinlichste Intensitätsverteilung im Bild zu berechnen. Hierzu könnte man schließlich einfach $\mathbf{I} = \mathbf{b}$ setzen. Stattdessen ist die Objektverteilung ρ gesucht, welche durch Faltung mit der PSF \mathbf{I} ergibt.

Für diesen Zweck wird nun $\mathbf{I}_{\text{sort},j}$ als Faltung des Objekts mit der PSF dargestellt. Hierzu wird angenommen, dass das Objekt wie das Bild aus m Pixeln im Ortsraum aufgebaut ist.

$$\mathbf{I}_{\text{sort},j} = \sum_{i=1}^m \mathbf{h}_{ji} \rho_i \quad (5.53)$$

Die Elemente der Faltungsmatrix \mathbf{h}_{ji} wurden hier vektoriell angegeben, damit durch die Faltung des Objekts mit der PSF das vektorielle Bild mit den unterschiedlichen zugrundeliegenden Beleuchtungsmustern erzeugt wird. Dieser Ausdruck wird in die neg-log-Likelihoodfunktion (5.52) eingesetzt und es wird ihr Gradient nach den Elementen von ρ gebildet. Hierbei wird der lediglich vom gemessenen Bild abhängige Term direkt vernachlässigt.

$$\frac{\partial l(S)}{\partial \rho_l} = \sum_{j=1}^m \sum_{s=1}^n \frac{\partial}{\partial \rho_l} \left(-\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{b}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s \ln [\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{I}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s] + \mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{I}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s \right) \quad (5.54)$$

$$\frac{\partial l(S)}{\partial \rho_l} = \sum_{j=1}^m \sum_{s=1}^n \underbrace{\left[\frac{\partial}{\partial \rho_l} \left(\mathbf{A}_j^{-1} \sum_{i=1}^m \mathbf{h}_{ji} \rho_i \mathbf{e}_s \right) \right]}_{\text{innere Abl.}} \cdot \underbrace{\left[1 - \frac{\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{b}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s}{\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{I}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s} \right]}_{\text{äußere Abl.}}$$

$$\frac{\partial l(S)}{\partial \rho_l} = \sum_{j=1}^m \sum_{s=1}^n \mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{h}_{jl} \mathbf{e}_s \left[1 - \frac{\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{b}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s}{\mathbf{A}_j^{-1} \mathbf{I}_{\text{sort},j} \mathbf{e}_s} \right] \quad (5.55)$$

Die Summe über alle Pixel j ergibt zusammen mit der PSF-Komponente \mathbf{h}_{jl} eine Faltung mit der transponierten Faltungsmatrix \mathbf{H}^T , also mit der gespiegelten PSF. Zusätzlich muss das Ergebnis aber auch nochmals mit der invertierten Sortiermatrix multipliziert werden. Die Gradientenbilder mit unterschiedlichem Beleuchtungsmuster werden anschließend aufsummiert.

5.2.6.2 Praktische Realisierung

Für die Anwendung der Pixelsortierung müssen alle Parameter des Beleuchtungsmusters (Gittervektoren, Phasen, Amplituden) bekannt sein. In der Praxis sind die Gittervektoren und die Phasen insbesondere beim Kombimikroskop (Abschnitt 4.3) mit einem nicht vernachlässigbaren Fehler behaftet. Aus diesem Grund wird zunächst die konventionelle frequenzraumbasierte Rekonstruktion mit dem Softwarepaket von Rainer Heintzmann durchgeführt. Hierbei werden unter anderem diese Parameter *a posteriori* anhand der Daten bestimmt.

Mithilfe der Parameter des Beleuchtungsmusters wird die Sortierungsmatrix \mathbf{A} berechnet und auf das Bild angewandt, um die sortierten Bilder mit verschiebungsinvarianter Beleuchtung zu erzeugen.

Die resultierende PSF der sortierten Bilder muss ebenfalls berechnet werden. Hierzu wird das Beleuchtungsmuster erzeugt und unter den gegebenen resultierenden Beleuchtungsphasen mit der Weitfeld-PSF multipliziert.

Die sortierten Bilder werden zusammen mit den entsprechenden PSFs und der invertierten Sortierungsmatrix der Entfaltungsfunktion übergeben. Hierzu stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

- Die für diesen Zweck modifizierte Entfaltungsoftware „GenericDeconvolution“ von Rainer Heintzmann. Diese Entfaltungsoftware ist für *multi-view*-Dekonvolution

ausgelegt [74] und eignet sich daher gut für die Verwendung einer Reihe von Bildern mit unterschiedlichen PSFs. Das Programm erlaubt die Annahmen von Poisson'schem und Gauß'schem Rauschmodell und die Nutzung verschiedener Regularisierungsterme zur Rauschunterdrückung. Ein zusätzlicher Regularisierungsterm verhindert negative Objektwerte. Zur Steuerung der Änderungsschrittweite und -richtung wird hierbei auf die Minimierungsfunktion „minFunc“ [75] von Mark Schmidt zurückgegriffen. Zur Schrittbestimmung wird das *limited-memory BFGS*-Verfahren [76] verwendet. MinFunc wurde zudem von Rainer Heintzmann leicht modifiziert, damit es direkt den CudaMat-Datentyp verwenden kann.

- Eine weniger komplexe Entfaltung basierend auf der Richardson-Lucy-Methode (direkte Anwendung der Änderung als Taylornäherung erster Ordnung aus dem Gradienten ohne Schrittweiten oder -richtungssteuerung). Die Regularisierung wird durch einen rechtzeitigen Abbruch der Entfaltung erreicht. Hierzu kann entweder eine begrenzte Anzahl an Iterationen vorgegeben werden, oder es kann mittels Kreuzvalidierung die Abbruchbedingung während der Entfaltung überprüft werden. Zu diesem Zweck wird eine Anzahl von Pixeln bei der Entfaltung nicht berücksichtigt. Im Gegenzug wird für lediglich diese Pixel das neg-log-Likelihoodfunktional in jedem Iterationsschritt separat berechnet, ohne die aus den ausgelassenen Pixeln resultierende Änderung anzuwenden. Sobald dieses Kreuzvalidierungsfunktional ein Minimum aufgewiesen hat, also signifikant wieder ansteigt, wird das Verfahren abgebrochen. Bei der Entfaltung der SIM-Daten führt es nicht zu sichtbaren Artefakten, wenn einige wenige gleichmäßig verteilte Pixel ausgelassen werden. Bei der Entfaltung werden die Gitterorientierungen sequentiell nacheinander für die Entfaltung verwendet und das Objekt wird jeweils nach jeder Richtung angepasst.

Um den Vorteil der Kenntnis der Nichtnegativität des Objekts in der Praxis nutzen zu können, ist es wichtig, dass das konstante Hintergrundsignal nicht durch den Algorithmus dem Objekt zugeordnet wird. Hierzu wird im Rahmen der Vorwärtssimulation die Hintergrundintensität zum Bild hinzuaddiert. Der Hintergrund wird dabei als konstant angenommen und *a priori* fest vorgegeben. Für dieses Verfahren muss der Hintergrund präzise abgeschätzt werden. Ein zu hoher angenommener Hintergrund verfälscht das Objekt, ein zu niedriger reduziert die Vorteile der Nichtnegativitätsbedingung.

5.2.6.3 Entfaltung zweidimensionaler Daten

Wenn man die Entfaltung auf zweidimensionale Daten anwendet, muss das Bildgebungsmodell weiterhin dreidimensional sein, um *optical sectioning* zu erreichen. Bei Verwendung eines zweidimensionalen Modells würde nicht der Tatsache Rechnung getragen, dass ein Teil des Lichts aus höheren und tieferen Schichten stammt. Um ein dreidimensionales

Modell zu nutzen, werden über und unter der Objektebene weitere Schichten angehängt. Diese werden allerdings nach der Vorwärtssimulation nicht für die Berechnung der Likelihoodfunktion und die daraus resultierende Bestimmung des Gradienten verwendet. Hierdurch wird während der Entfaltung ein Teil des Signals auf die anderen, nicht betrachteten Ebenen verteilt. Die hochauflösende Information, welche aufgrund der OTF lediglich aus der aufgezeichneten Ebene stammen kann, wird jedoch ebendieser Ebene zugeteilt. Betrachtet man im entfalteten Ergebnis lediglich diese Ebene, stellt sie einen optischen Schnitt durch das Objekt dar.

5.3 Das Ophthalmoskop mit strukturierter Beleuchtung

5.3.1 Planung und Entscheidungsfindung

Die Planung des Ophthalmoskops zur Bildgebung der Autofluoreszenz im Augenhintergrund basierte auf den folgenden Zielen:

- Eignung in Hinblick auf die besonderen Begebenheiten des menschlichen Auges
- Unbedenklichkeit für den Probanden
- Kosteneffizienz
- Kompaktheit/Transportierbarkeit

Da die Untersuchung des Auges nichtinvasiv durch die Pupille geschieht, muss mit den optischen Eigenschaften des Auges vorliebgenommen werden. Diese Eigenschaften sind, wie in den Grundlagen beschrieben (Kapitel 4.4.5), in vielerlei Hinsicht wesentlich schlechter als bei künstlichen optischen Systemen.

Aufgrund dieser Einschränkungen stellte sich zunächst grundsätzlich die Frage, ob die strukturierte Beleuchtung an einem typischen Auge überhaupt in der Lage sein würde, ein im Vergleich zur Weitfeldaufnahme verbessertes Bild zu generieren. Die Rekonstruktion der SIM-Daten basiert in der Regel darauf, dass die PSF des optischen Systems einigermaßen bekannt ist. Nachdem die frequenzverschobenen Ordnungen des Bildes getrennt und die Frequenzverschiebung korrigiert wurden, wird auf jede Ordnung eine individuelle Frequenzgewichtung angewandt, bevor die Ordnungen addiert werden. Diese Gewichtung basiert auf der OTF, also der Fourier-transformierten PSF. Da die PSF des Auges allerdings unbekannt ist, ist die Frequenzgewichtung in großem Maß fehlerbehaftet. Aus diesem Grund wurde simuliert, wie sich eine Rekonstruktion am strukturiert beleuchteten Augenhintergrund auswirkt, wenn die Bildfrequenzen keine Gewichtung erfahren. Hierzu wurde die resultierende PSF bei strukturierter Beleuchtung ohne ortsabhängige Gewichtung der Ordnungen berechnet. Das Ergebnis dieser Simulation ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Für die Simulation wurde eine zweidimensionale PSF eines menschlichen Auges verwendet [77]. Die Ausdehnung der PSF entlang der optischen Achse ist aufgrund der geringen numerischen Apertur des Auges wesentlich größer, als die Ausdehnung der Dicke der hauptsächlich fluoreszierenden Schicht, weswegen man hierfür ein zweidimensionales Modell verwenden kann.

Offensichtlich führt strukturierte Beleuchtung bei stark aberrierter PSF auch ohne Gewichtungskorrektur zu einer wesentlich schmaleren PSF und damit zu einer deutlich besseren Auflösung. Verwendet man für das Maß der Auflösungsverbesserung die Halbwertsbreite der PSF, reicht die Verbesserung über einen Faktor zwei hinaus.

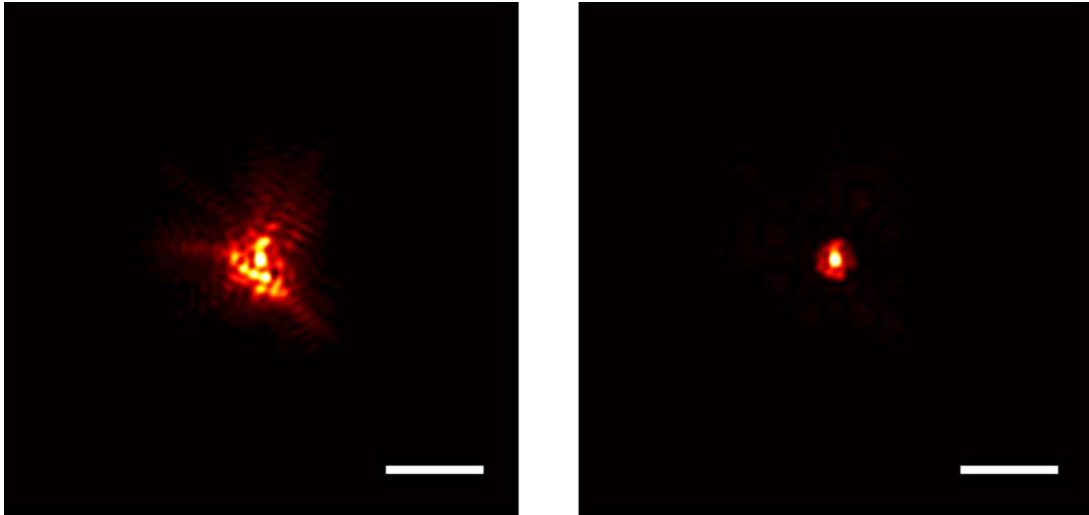


Abbildung 5.10: Simulation der PSF des Auges bei strukturierter Beleuchtung. PSF aus [77]. Es wurde die Falschfarbendarstellung „hot“ verwendet um einen vergrößerten Dynamikumfang wahrnehmbar zu machen. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von $20 \mu\text{m}$

Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Bildgebung des Augenhintergrundes sind die Augenbewegungen (siehe Kapitel 4.4.5.4). Wenn die Integrationszeit der Kamera unter etwa 50ms beträgt, steht das Auge während der Aufnahme jedoch relativ still, solange sich innerhalb dieses Zeitraums keine Mikrosakkade ereignet. Um innerhalb dieses kurzen Zeitraumes aber ein ausreichendes Autofluoreszenzsignal zu erhalten, ist dazu eine hohe Intensität der Beleuchtung erforderlich (bei der gewählten Vergrößerung von 1,90 sind $100\text{mW}/\text{cm}^2$ erforderlich). Da die maximale Bildwiederholfrequenz der zu Verfügung stehenden Kamera bei Verwendung eines großen Bildausschnittes allerdings lediglich 10Hz beträgt und zudem auch die Änderung des Beleuchtungsmusters einen größeren Zeitraum in Anspruch nimmt, ist die Kamera nur während eines Teils der Gesamtdauer des Experiments aktiv. Würde die Autofluoreszenzbeleuchtung kontinuierlich das Auge bestrahlen, würde eine unnötig hohe, potentiell schädliche Energie pro Fläche im Auge deponiert. Aus diesem Grund wurde die Beleuchtung mit der Aufnahme synchronisiert. Zudem mussten wegen der hohen erforderlichen Lichtleistung Vorkehrungen getroffen werden, damit das Auge nicht versehentlich über einen längeren Zeitraum beleuchtet wird.

Primär sollte das Gerät die von den Lipofuszingranula stammende Autofluoreszenz im RPE aufzeichnen. Da Lipofuszin ein sehr breites Anregungsspektrum besitzt (siehe Abbildung 4.17, Kapitel 4.4.2), kam prinzipiell eine große Auswahl an möglichen Lichtquellen in Frage. Da die Beleuchtung für das Ophthalmoskop aufgrund der Augenbewegungen gepulst mit einer Beleuchtungsdauer von unter 50ms realisiert werden musste, war unter Berücksichtigung der Fluoreszenzstärke, der Vergrößerung und des Lichtverlustes im Auge, durch das Beleuchtungsgitter, die Strahlaufweitung und die restliche Optik eine Ausgangsleistung von je nach Wellenlänge über 500mW bis 1W erforderlich. Aufgrund der erforderlichen hinreichenden Monochromatik (Spektralbreite $< 20\text{nm}$ zur Trennung von

Anregungs- und Fluoreszenzlicht), einer näherungsweise Punktförmigkeit der Lichtquelle (zur kongruenten Strahlführung) und der notwendigen Lichtleistung stellte ein Laser das Mittel der Wahl dar.

Zur Erzeugung des Beleuchtungsmusters, welches auf den Augenhintergrund projiziert werden sollte, fiel die Entscheidung auf einen *Spatial Light Modulator* (SLM). Der Terminus SLM bezeichnet Apparate, welche ortsabhängig Intensität, Phase oder Polarisation von Licht manipulieren können. Die Verwendung eines SLM zur Mustererzeugung hat gegenüber einem festen Gitter oder einem Interferometer den Vorteil, dass je nach Bedarf beliebige Muster erzeugt werden können. Hierdurch kann problemlos die Gitterkonstante des verwendeten Musters an die gegebenen Umstände angepasst werden.

5.3.2 Aufbau

5.3.2.1 Laser

Kommerzielle Scanning-Laser-Ophthalmoskope nutzen zur Fluoreszenzanregung die Wellenlänge von 488 nm (Ar⁺-Laser oder DPSS-Laser), die im Maximum des Anregungsspektrums des Fluorescein liegt und mutmaßlich aus diesem Grund Verwendung findet. Da diese Geräte kontinuierlich das Auge Punkt für Punkt abrastern, ist hierbei eine Laserausgangsleistung von 50 mW mehr als ausreichend. Laser in diesem Wellenlängenbereich mit einer Ausgangsleistung von über 500 mW waren allerdings zum Zeitpunkt der Recherche (2010) relativ teuer (über $20\,000\text{ €}$). Nah an dieser Wellenlänge liegen DPSS-Laser mit 473 nm Wellenlänge. Es ist allerdings zu beachten, dass die Verwendung dieser Wellenlänge im Vergleich zu 488 nm eine um 55% erhöhte Gefährdung durch photochemisch erzeugte Radikale ergeben hätte (siehe Abbildung 5.11) und zudem das Makulapigment in diesem Bereich das Licht mit maximaler Effizienz absorbiert und damit das Signal abschwächt.

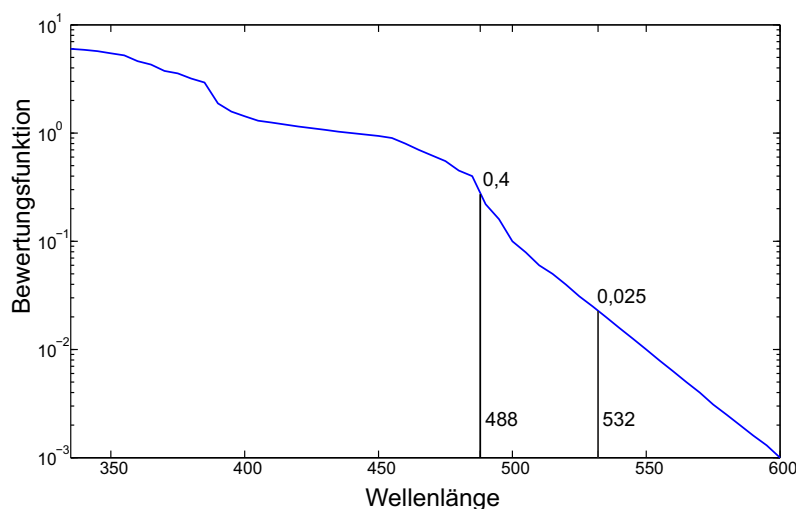


Abbildung 5.11: Bewertungsfunktion der photochemischen Schädigung nach ISO 15004-2:2007

Unter Berücksichtigung des Lipofusinspektrums im Auge (siehe Abbildung 4.17) fiel die Entscheidung für einen kontinuierlich strahlenden grünen (532 nm) DPSS-Laser (frequenzverdoppelnder Nd:YAG-Laser). Diese Laser gehören bei hohen Ausgangsleistungen zu den kostengünstigsten Geräten im sichtbaren Spektralbereich. Die Wellenlänge liegt überdies im Maximum des Anregungsspektrums des Lipofusins. Ein sicherheitsrelevanter Vorteil dieser Wellenlänge ist, dass die Radikalerzeugung im Vergleich zu blauem Licht um ein Vielfaches reduziert ist, weswegen die photochemische Bewertungsfunktion nach der geltenden Norm ISO 15004-2:2007 (Abbildung 5.11) für 532 nm nur 1/16 des Wertes für 488 nm beträgt.

Der Nachteil der Wellenlänge ist jedoch, dass die Aufzeichnung der Fluoreszenz, die bei Angiographien verwendet wird, nur mit sehr geringer relativer Effizienz (etwa 5% verglichen mit 488 nm-Anregung [78]) durchgeführt werden kann.

Der angeschaffte Laser ist das Modell MLL-H-532nm-500mW der Roithner Lasertechnik GmbH (Wien, Österreich). Der Laser hat eine nominelle Ausgangsleistung von 500 mW (gemessen: 792 mW \pm 0,585 % über 4 h) und besitzt eine geringe Fluktuation der Amplitude von nominell unter 0,7 %.

Das Laserlicht wird mit einem dichroitischen Langpass-Strahlteiler (Transmission ab 545 nm) in den Strahlengang in Richtung Auge eingebracht. Das Fluoreszenzlicht, welches in der Gegenrichtung vom Auge kommend auf den Filter trifft, wird transmittiert. Um das verbleibende rückgestreute und reflektierte Laserlicht zu sperren, welches den Strahlteiler in geringem Anteil durchdringt, wird vor der letzten Linse vor der Kamera ein Langpass-Sperrfilter verwendet. Für diesen Zweck wurden zwei Filter angeschafft mit Grenzwellenlängen bei 545 und 568 nm. Der Filter mit weiter von der Anregungswellenlänge entfernt liegender Übergangswellenlänge von 568 nm wurde besorgt, um einen Großteil des unerwünschten unspezifischen Autofluoreszenzlichts von Augenlinse, Glaskörper und Netzhaut zu sperren und somit den Kontrast zu verbessern. In der klinischen Studie stellte sich aber heraus, dass dies aufgrund der geringen Auswirkung der unerwünschten Autofluoreszenz nicht notwendig war, weswegen im weiteren Verlauf lediglich der kurzwelligere Filter verwendet wurde um somit das Lipofusinsignal mit bestmöglicher Effizienz zu erhalten.

Zur Variation der Lichtleistung wurde hinter dem Laser ein Graufilterrad mit einer optischen Dichte zwischen 0 (100 % Transmission) und 4 (1% Transmission) platziert. Das Rad ist scheibenförmig und seine optische Dichte steigt kontinuierlich mit dem Azimut. Das Licht wird hierzu durch eine wärmebeständige metallische Beschichtung an der Vorderfläche des Filters auf eine Strahlfalle reflektiert. Das Graufilterrad wird lediglich für Justagezwecke verwendet. Für die Aufnahme von Autofluoreszenzbildern ist es maximal transmittierend eingestellt.

5.3.2.2 Laserblende

Für die einzelnen Beleuchtungspulse muss der Laser mit hoher Geschwindigkeit an- und abgeschaltet werden können. Der Laser verfügt zwar über einen TTL-Eingang (Transistor-Transistor-Logik), über den er durch Schaltung der Pumpdiode mit hoher Frequenz geschaltet werden kann, allerdings benötigt er nach Bestromung der Diode eine Aufwärmzeit von etwa 15 Sekunden, um stabil zu strahlen. Dies kann damit erklärt werden, dass der Laserkristall zunächst eine bestimmte zeitlich konstante Temperaturverteilung einnehmen muss, um die vorgesehene Geometrie einzunehmen. Aus diesem Grund musste die Schaltung des Lasers extern bei konstantem Betrieb mit maximaler Ausgangsleistung erfolgen. Hierzu fiel die Entscheidung auf eine schnelle mechanische Blende und nicht etwa auf einen akustooptischen Modulator (AOM). Um bei einem AOM eine hohe Streueffizienz zu erreichen, muss der Strahldurchmesser ein Vielfaches (etwa 100-fach) der Schallwellenlänge besitzen. Aufgrund der kompakten Bauweise des Ophthalmoskops wäre dies nur umständlich zu realisieren gewesen. Die angeschaffte Blende (LS2Z2-NL, Uniblitz Shutter Systems, Rochester, NY, USA) weist eine Transferdauer von etwa 400 μs auf, was für den Einsatzzweck hinreichend kurz ist. Auf der Laserseite ist eine hitzebeständige reflektierende AlSiO-Beschichtung aufgebracht. Das im geschlossenen Zustand reflektierte Licht fällt in eine Strahlfalle, welche gleichzeitig zur Detektion des Lasers im Rahmen der Sicherheitsabschaltung dient.

5.3.2.3 Ansteuerung mittels Mikrocontroller

Zur Ansteuerung von Geräten auf einer Zeitskala von unter einer Millisekunde sind Computer mit komplexem Betriebssystem nicht geeignet, da die auftretende Verzögerung unvorhersehbar von diversen parallel laufenden Prozessen beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde für die Initiierung der zeitkritischen Vorgänge ein Arduino Uno Mikrocontroller verwendet. Mithilfe von Mikrocontrollern ist es möglich, lediglich einen einzigen Programmfaden sequentiell ablaufen zu lassen, wodurch die Zeiten der einzelnen Befehle sehr gute Reproduzierbarkeit aufweisen. Das Arduino-Projekt wurde im Interaction Design Institute in Ivrea, Italien, begründet. Ziel war es, quelloffen einen einfachen, kostengünstigen Mikrocontroller samt Software zu entwickeln, welcher unter anderem die Ansteuerung von Kunstinstallationen vereinfachen sollte. Der Arduino Uno ist ein verhältnismäßig einfacher (Takt: 16 MHz, Speicher: 32 KB) und kostengünstiger Mikrocontroller. Die Software kann in der Programmiersprache C++ geschrieben werden und es ist umfangreiche Dokumentation mit diversen Beispielprogrammen verfügbar, was seinen Einsatz ohne große Vorkenntnisse möglich macht. Es stehen 14 binäre Anschlüsse zur Verfügung, welche sowohl als Ein-, als auch als Ausgang verwendet werden können. Darüber hinaus sind 6 Eingänge mit analog-zu-digital-Wandlern zum Aufzeichnen analoger Signale vorhanden. Zum Anschluss an einen Computer besitzt der Mikrocontroller ei-

ne USB-Buchse mit anschließendem USB-auf-RS232-Adapter, womit der Arduino für den Computer als serielles Gerät (RS-232) erscheint. Um über den Computer dem Arduino während der Programmlaufzeit direkt den Befehl geben zu können und somit bestimmte Funktionen aufzurufen, um zum Beispiel einzelne Ausgänge zu schalten, musste zunächst eine Kommunikations-Syntax entwickelt werden. Diese Syntax besitzt zwei Ebenen:

- eine komplexere systematische Syntax zur Ansteuerung und zum Auslesen einzelner Anschlüsse: Hierbei wird ein Muster in der Form Vorgang–Ort–Wert verwendet. Soll beispielsweise Pin 7 auf *high* geschaltet werden, muss über die serielle Schnittstelle „set pin 7 high\n“ übertragen werden. Das Senden, Auslesen und Verarbeiten dieser Befehle benötigt eine gewisse Zeitspanne. Diese komplexe Syntax wurde im wesentlichen zur Überprüfung der Geräte und der Schaltung verwendet.
- eine einfache, direkte Syntax zur Initiierung der zeitkritischeren Vorgänge. Hierzu werden lediglich zwei Byte an den Arduino übertragen. Um zum Beispiel ein Einzelbild aufzunehmen, genügt es, den Befehl „a\n“ zu senden.

Wird ein kurzer Befehl, bestehend aus einem Buchstaben, gefolgt von einem Zeilenumbruch an den Mikrocontroller gesendet, wird die komplexere Routine zur Entschlüsselung des gesendeten Textes übersprungen, und die entsprechenden Anweisungen werden unmittelbar ausgeführt. Die Zeitgebung der Aufnahme eines Einzelbildes wird autonom durch den Mikrocontroller verwaltet. Hierzu wird zunächst ein binäres Startsignal an die Kamera gesendet. Kurz darauf wird die Laserblende über ein definiertes Zeitfenster ebenfalls mittels TTL-Signal geöffnet.

5.3.2.4 Ansteuerungsplatine und Sicherheitsabschaltung

Eine direkte Ansteuerung der Endgeräte mit dem Mikrocontroller ist in der Regel nicht möglich, da die Ausgangsströme der Pins des Arduino (40 mA) oft unter dem erforderlichen Wert liegen, um die *pull-up* bzw. *pull-down* Widerstände des TTL-Eingangs der Geräte zu überwinden. Daher ist eine zusätzliche Schaltung (hier mithilfe von Logik-Gattern) erforderlich, um die Schaltströme des Mikrocontrollers zu verstärken. Der Schaltplan der Ansteuerungsplatine ist in Abbildung 5.12 dargestellt.

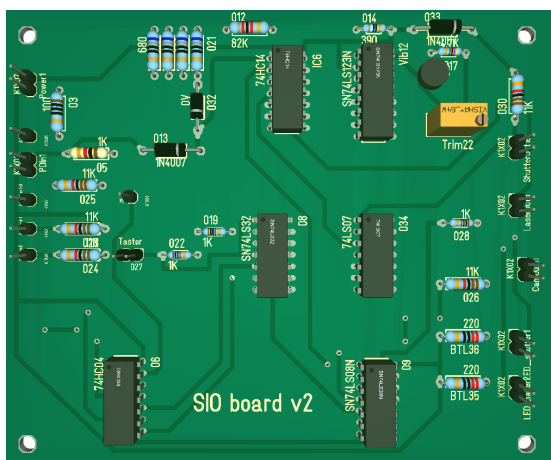
Bei einer Ansteuerung eines Gerätes über Software oder Hardware ist eine Fehlfunktion niemals auszuschließen. Insbesondere bei der Software – sei es auf dem PC oder auf einem Mikrocontroller – ist das Vorhandensein von Fehlern durch die zugrundeliegende Komplexität wahrscheinlich. Auf Hardwareseite kommt zusätzlich zu eventuellen Planungsfehlern ein Fehlerpotential durch den Ausfall einzelner Komponenten hinzu. Um dafür Sorge zu tragen, dass das Auge durch den zu einem Leerlauf führenden Ausfall eines Bauteils der

Controller-Platine keiner langanhaltenden Laserbestrahlung unterliegt, wurden die *pull-up* bzw. *pull-down* Widerstände in der Schaltung jeweils so gewählt, dass ein Leerlauf im Signalweg zur Abschaltung des Lasers und zu Schließen der Blende führt.

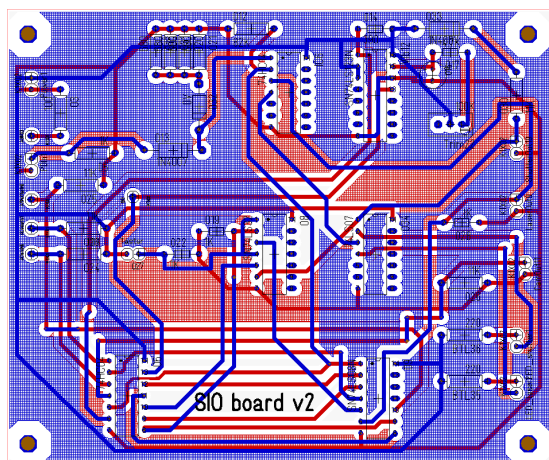
Um darüber hinaus bei Fehlfunktionen den Laser notfallmäßig auszuschalten und zugleich die Blende zu schießen, wurde eine Sicherheitsabschaltung realisiert, welche den Beleuchtungsstatus überwacht und bei einer Überschreitung der maximal vorgesehenen Beleuchtungsdauer eine Abschaltung bewirkt. Diese Notabschaltung basiert auf der permanenten Überwachung des Beleuchtungsstatus durch eine Photodiode. Die Strahlfalle für den von der Blende reflektierten Laserstrahl ist ein Aluminiumquader mit einer etwa 30 mm tiefen und 4 mm breiten Bohrung, in welche der Laserstrahl gelenkt wird. Diese Bohrung ist an ihrem Ende wiederum seitlich mit geringer Tiefe mit einem Durchmesser von 12 mm angebohrt. Aufgrund der konischen Form der Spitze dieser Bohrung wird ein Großteil des Lichts, das nicht innerhalb der Strahlfalle absorbiert wurde, aus der seitlichen Öffnung gelenkt. Die Frontseite der Strahlfalle wurde mit Kerzenruß geschwärzt, um eventuell auf diese treffendes Laserlicht größtenteils zu absorbieren. Bündig an die seitliche Öffnung der Falle wurde ein Photodetektor (Thorlabs PDA36A; photodiodenbasiert mit einstellbarem Verstärker) montiert. Mit dem Detektor wird überwacht, ob der Laser an der Blende reflektiert wird, ob also die Blende im geschlossenen Zustand ist. Durch Verwendung einer monostabilen Kippstufe (der stabile Zustand führt zu Notabschaltung) lässt es die Schaltung zu, dass für einen kurzen Zeitraum von der Photodiode kein Signal detektiert wird, ohne dass dadurch eine Notabschaltung hervorgerufen wird. Dieser Zeitraum ist auf 60 ms festgelegt, während die maximal vorgesehene Belichtungsdauer für ein Einzelbild 50 ms beträgt. Aufgrund der Funktionsweise der Notabschaltung ist es nicht ohne weiteres möglich, den Laser zu starten, wenn dieser erst einmal über einen längeren Zeitraum abgeschaltet war. Daher lässt sich über einen Taster manuell die Abschaltung des Lasers überbrücken um diesen zu starten. Während der Verwendung des Tasters wird an die Blende das Schließsignal gesendet. Es ist zu erwähnen, dass die Notabschaltung des Systems nicht zwingend notwendig ist, um die Sicherheit der Probanden nach der gültigen Norm (ISO 15004-2:2007) zu gewährleisten. Auch eine konstante Beleuchtung des Auges über einen Zeitraum von knapp einer Minute entsprechend der Norm nicht zu einer Überschreitung der Grenzwerte führen. Eine mehrere Sekunden andauernde Beleuchtung wäre allerdings mit Sicherheit unangenehm für den Probanden und nicht gesundheitsförderlich, da man prinzipiell davon ausgehen kann, dass sich jegliches künstlich ins Auge eingestrahlt Licht negativ auswirkt. Die Spannungsversorgung der Schaltung und des Mikrocontrollers erfolgt über das Netzgerät des Computers des Aufbaus.

5.3.2.5 Gittererzeugung für strukturierte Beleuchtung

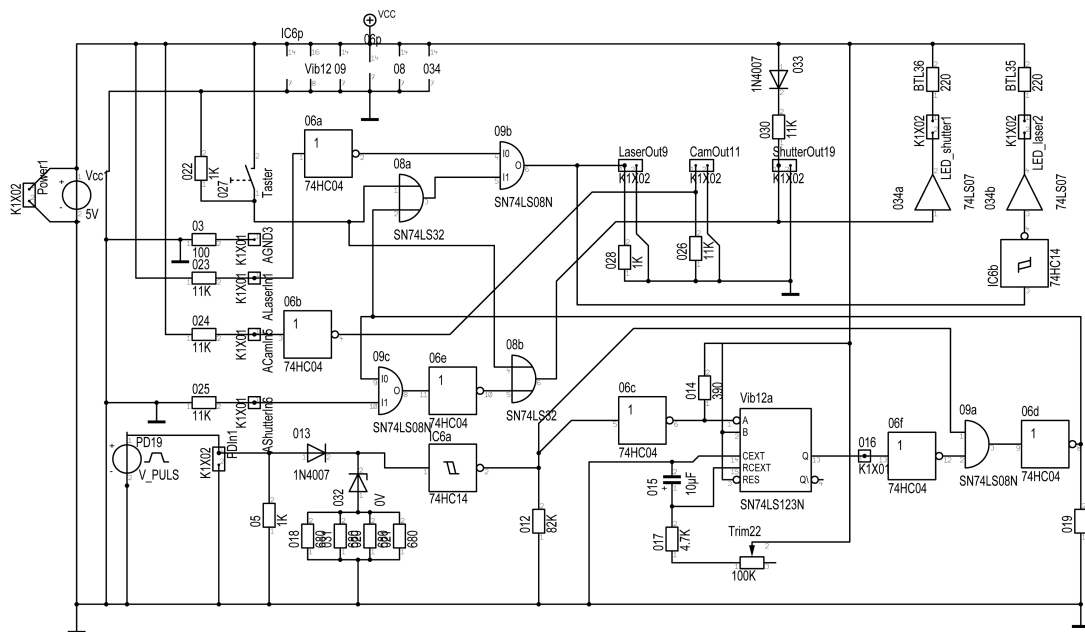
Während LCoS-basierende (*Liquid Crystal on Silicon*) SLO für die wissenschaftliche Ver-



(a) 3D-Simulationsansicht der bestückten Bauteilseite der Platine.



(b) Leiterbahnenansicht der Ansteuerungsplatine. Die blaue Farbe kennzeichnet die bauteilseitigen Bahnen, während die Bahnen auf der Rückseite rot dargestellt sind. Die Massefläche auf der Bauteilseite führt die Versorgungsspannung während die Massefläche auf der Unterseite mit Masse verbunden ist.



(c) Platinschaltplan. Die Eingänge sind links in der Mitte angeordnet, die Ausgänge oben rechts.

Abbildung 5.12: Ansteuerungsplatine des Ophthalmoskops. Für die Sicherheitsabschaltung, welche lediglich eine kurzzeitige Beleuchtung des Auges zulässt, wurde eine monostabile Kippstufe (der IC oben rechts in der 3D-Ansicht) verwendet. Für die Konzeption der Platine und zur Erstellung der gezeigten Abbildungen wurde die Software Target 3001! in der kostenlosen Ausführung verwendet.

wendung in der Regel eine hohe Lichteffizienz (Verhältnis der aktiven Fläche zur Gesamtfläche; genannt Füllfaktor: 90 %) besitzen und viele Optionen zur Ansteuerung bieten (z.B. interner Bildspeicher und externe Triggerung) und über gute Dokumentation und Software-Kits verfügen, waren geeignete Geräte mit einer ausreichenden Zahl an Pixeln zum Zeitpunkt der Recherche so teuer, dass ihr Einsatz nicht möglich war.

Daher wurde ein transmittierendes Flüssigkristalldisplay verwendet, welches für den Einsatz in Videoprojektoren (umgangsspr. Beamer) konzipiert wurde (siehe Teileliste A.6). Das verwendete Display (Epson L3C07U-85G10; Epson D7 LCD Kit, BBS Bildsysteme, Bad Wiessee) hat eine Pixelgröße von $8,5 \mu\text{m}$, einen Füllfaktor von 52 % und eine Auflösung von 1920×1080 . Die Flüssigkristallzellen werden im VA-Modus (*vertical alignment*) betrieben. Im Gegensatz zu den gebräuchlicheren TN (*twisted nematic*) Zellen findet hierbei keine helikale Anordnung der Flüssigkristallmoleküle statt. Bei der VA-Anordnung sind die (dipolaren) Moleküle des Flüssigkristalls im Normalzustand, in welchem keine Spannung angelegt ist, vertikal zu den Endflächen ausgerichtet (dies wird in der Regel durch polare Beschichtung der Endflächen erreicht). Für das parallel zu den Zellen eingestrahlte Licht gibt es keine Vorzugsrichtung. Es passiert den Kristall ohne Polarisationsänderung.

Durch Anlegung einer Spannung richten sich die Moleküle zunehmend vertikal zu den Endflächen entlang einer gemeinsamen Achse aus, welche zur Polarisation des eingestrahnten Lichts im 45° -Winkel steht. Der senkrecht zu den ausgerichteten Molekülen polarisierte Teil des Lichts erfährt nun einen anderen Brechungsindex als der zu diesen parallel polarisierte. Durch geeignete Festlegung der Tiefe der Flüssigkristallschicht und der anlegbaren Spannung lässt sich maximal analog zur Halbwellenplatte die Polarisation des Lichts um 90° drehen. Spannungswerte zwischen den Extremen, welche linear polarisiertes Licht generieren, führen zu elliptischer Polarisation. Mithilfe eines Analysators lässt sich eine Intensitätsmodulation des transmittierten Lichts erreichen.

Bei dem verwendeten μ -LCD-Kit ist die an den Zellen anliegende Spannung proportional zum Grauwert des über den DVI-Anschluss des Computers an den Controller gesendeten Bildes (nur der grüne Kanal wird verwendet). Der Anteil des durch den Analysator transmittierten Lichts ist jedoch nicht proportional zu dieser Spannung und ähnelt einem Tangens Hyperbolicus mit nichtlinearer (quadratisch gestreckter) Ordinate (siehe Abb. 5.13). Zur Erhebung der abgebildeten Messdaten wurden jeweils alle Pixel des Displays mit dem gleichen Grauwert angesteuert und die transmittierte Lichtleistung wurde mit einem wärmefühlenden Leistungsmessgerät (Scientech Mentor MA10, Messkopf 360203M) für verschiedene Grauwerte gemessen. Auffällig ist, dass erst ab etwa 30% der Maximalspannung die Transmittivität merklich ansteigt. Unterhalb dieses Wertes findet also noch keine deutliche Neuausrichtung der Flüssigkristallmoleküle parallel zu den Grenzflächen statt.

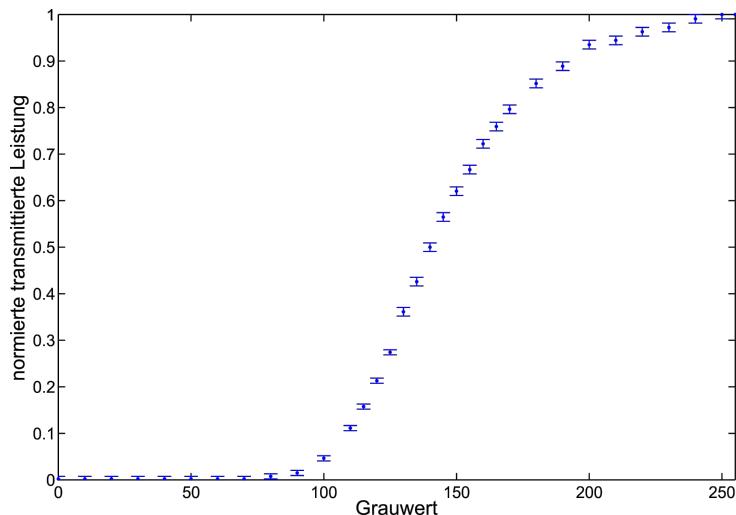


Abbildung 5.13: Gemessene transmittierte Lichtleistung nach dem Analysator in Abhängigkeit des am LCD eingestellten Grauwertes. Die Leistungswerte sind auf den Maximalwert normiert.

Um trotz des nichtlinearen Verlaufs die Transmission gezielt einstellen zu können, musste die Umkehrfunktion der gemessenen Verlaufs gefunden werden um die gewünschte Ausgangsintensität in den entsprechenden Grauwert umrechnen zu können (aufgrund der Messungenauigkeit wäre eine simple *lookup table* unzureichend).

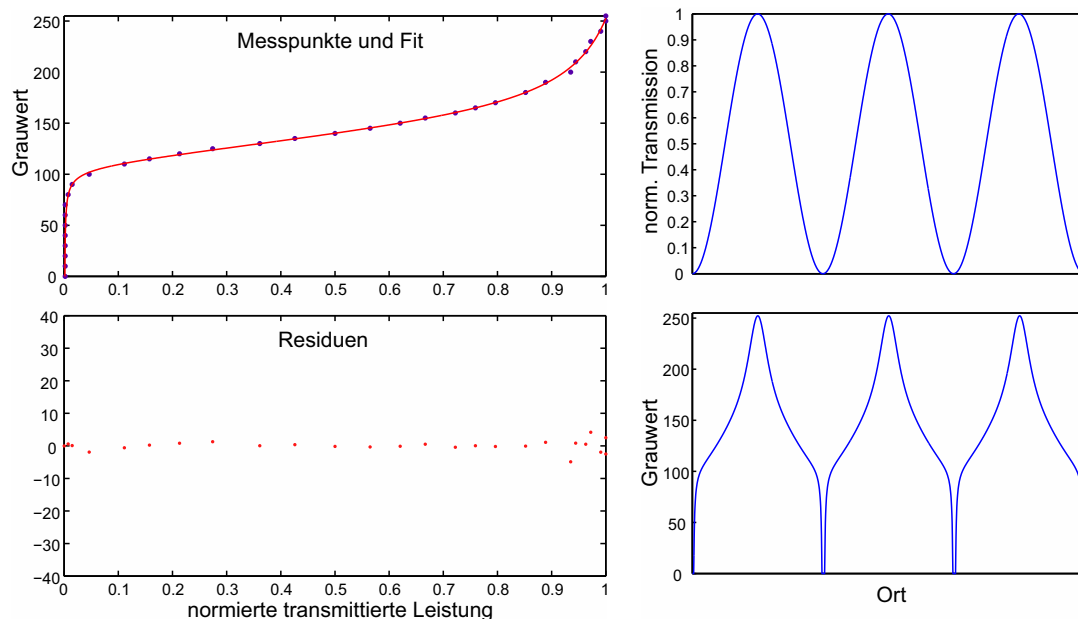
Die verwendete Fitfunktion (5.56) wurde durch ausprobieren gefunden, ist also rein deskriptiv und nicht auf der zugrundeliegenden Physik basierend.

$$T(x) = p_1 \tan(p_3(x^{p_4} - p_2)) + p_5 + p_6(x - p_7) \quad (5.56)$$

mit

$$p_1 = 10,5 ; \quad p_2 = 0,535 ; \quad p_3 = 3,15 ; \quad p_4 = 0,401 ; \quad p_5 = 147 ; \\ p_6 = 42,6 ; \quad p_7 = 0,856$$

Da es einfacher war, eine geeignete Fitfunktion für die Umkehrfunktion zu finden, als für die direkte Messung, wurde dieser Weg gewählt. Es muss darauf hingewiesen werden, dass streng genommen das (kleinste-Quadrate-basierte) Fitten der Umkehrfunktion an die Messdaten nicht korrekt ist, da unklar ist, wie sich der Messfehler des Funktionswertes auf den Fehler der Koordinate übersetzt. Hierfür wäre die noch zu bestimmende Fitfunktion bzw. in Näherung ihre Ableitung erforderlich. Das Fitten der Umkehrfunktion führt zu einer fehlerhaften Gewichtung der Messpunkte im Fitprozess. Um dies zu kompensieren, müsste theoretisch die Fitmethode entsprechend angepasst werden. Weil die Fitfunktion subjektiv die gemessenen Werte sehr gut wiedergibt ohne offensichtliche



(a) Fitkurve des Grauwertes in Abhängigkeit der Intensitätstransmission (oben). Die Abweichungen weisen nicht auf einen systematischen Fehler des Fits hin (unten). (b) Möchte man durch das LCD ein sinusoides Muster erzeugen (oben), muss dem Display eine durch die Kalibrationskurve beeinflusste Grauwertverteilung vorgegeben werden (unten).

Abbildung 5.14: Transmissionskalibrierung des LCD

systematische Abweichung (siehe Abb. 5.14(a)), wurde aber mit der erhaltenen Funktion vorliebgenommen. Bei LC-Displays kann es aufgrund des physikalischen Vorgangs der Orientierungsänderung der Moleküle theoretisch zu Hystereseeffekten kommen. Bei dem verwendeten Display konnte allerdings keine Hysterese beobachtet werden.

Da das Display transmittierend arbeitet und ein großer Teil der Displayfläche von der Ansteuerungselektronik belegt ist, sind auf Vorder- und Rückseite des Displays Arrays aus Mikrolinsen aufgebracht, um die Lichteffizienz zu erhöhen. Die Tatsache, dass das Display trotz der Mikrolinsen einen Füllfaktor von lediglich 52% besitzt, führt nicht nur zur Rückreflexion und Absorption von 48% des Lichts, sondern auch zur Beugung eines beträchtlichen Anteils des transmittierten Lichts am Pixelgitter. Der Anteil der transmittierten Lichtleistung, der sich in der nullten Beugungsordnung befindet, also nicht gebeugt wird, ist rechnerisch gleich dem Füllfaktor. Hieraus resultiert, dass maximal nur etwa 25% des Lichts am LCD weder gebeugt, noch reflektiert werden. Die große Gewichtung der vielen höheren Beugungsordnungen des Laserstrahls sowohl in Transmissions-, als auch in Reflexionsrichtung, die teilweise um große Winkel abgelenkt werden, sind entsprechend schwierig abzuschirmen und stellen im Umgang mit dem Display eine Gefahrenquelle dar, wenn bei geöffnetem Aufbau keine Schutzbrille getragen wird. Das anzuzeigende Bild auf dem Display wird mittels DVI-Anschluss vom PC an den LCD-Controller gesendet. Die Bildwiederholfrequenz liegt fix bei $f_r = 60\text{Hz}$. Da die Frequenz fest vorgegeben ist, wird

nach Änderung des Gittermusters jeweils so lange gewartet, dass das neue Muster in jedem Fall bereits fehlerfrei angezeigt wird, bevor die Aufnahme des Bildes gestartet wird. Die Wartezeit t_w ergibt sich aus

$$t_w = \max(t_{\text{jitter,max}} + t_{\text{LCD,response}}, t_{\text{cam,readout}}) \quad (5.57)$$

mit der maximalen Zeit bis zur Bildwiederholung

$$t_{\text{jitter,max}} = 1/f_r . \quad (5.58)$$

In dem verwendeten (triggerbaren) sequentiellen Modus der Kamera kann diese während des Auslesens des Bildes nicht bereits ein weiteres Bild aufzeichnen. Daher muss mit der folgenden Aufnahme gewartet werden, bis der Auslesevorgang abgeschlossen ist. Die erforderliche Zeit hierfür ist abhängig von der Größe des ausgelesenen Bereiches. Wird der gesamte Chip ausgelesen, beträgt sie bei der verwendeten Kamera $t_{\text{cam,readout}} = 100$ ms. Die Zeit $t_{\text{LCD,response}}$ drückt die Zeit aus, welche das LCD benötigt, um die gewünschte Transmission zu erreichen. Als Wartezeit hierfür wurden 50 ms eingestellt.

5.3.2.6 Streulichtbeleuchtung

Um den Probanden optimal vor dem Ophthalmoskop zu positionieren und die Fokusebene des Ophthalmoskops auf den Augenhintergrund einzustellen ist die Betrachtung der Autofluoreszenz ungeeignet, da hierzu verhältnismäßig hohe Intensitäten für das Anregungslicht erforderlich sind und der Proband dadurch unnötig belastet würde.

Daher wurde alleine für diesen Zweck ein zusätzlicher Beleuchtungsstrahlengang realisiert, welcher auf der Detektion von am Augenhintergrund gestreutem Licht beruht. Als Lichtquelle wird eine Leuchtdiode (*light emitting diode*, LED) mit einer Wellenlänge von 635 nm verwendet, welche damit auf dem Maximum der Autofluoreszenzemission des Augenhintergrundes liegt (siehe Spektren in Abbildung 4.17). Hiermit ist gewährleistet, dass nicht durch chromatische Aberration der Fokus fehlerhaft eingestellt wird.

Um den Fokus leichter finden zu können, wird eine Kalibrationsstruktur in den Augenhintergrund abgebildet. Diese besteht aus einer kreisförmigen Apertur (Öffnung) mit zwei feinen Streifen aus schwarzem Klebeband, die ein Kreuz bilden. Die freien Flächen der sich in einer konjugierten Bildebene befindenden Struktur werden in das Auge projiziert. Das Licht der LED durchläuft einen Diffusor, bevor es auf die Kalibrationsstruktur trifft. Hierdurch lässt sich die Struktur nur scharf abbilden, wenn die Reflexionsebene im Augenhintergrund in der Objektebene liegt. Das eingestrahelte rote Licht wird primär vom Hämoglobin im Blut der Aderhaut zurückgestreut. Aufgrund des Effektes

beim Lichtdurchgang durch die Photorezeptoren (siehe Abbildung 4.22) ist diese Struktur am schärfsten sichtbar, wenn sich die Objektebene auf den Photorezeptoren befindet. Diese Positionierung ist ebenfalls für die Autofluoreszenzaufnahme optimal. Das bei Verwendung der Streulichtbeleuchtung erhaltene Bild ist in Abbildung 5.15 zu sehen. Während der Autofluoreszenzbeleuchtung ist die LED ausgeschaltet. Die LED wird mit einem Bipolartransistor betrieben, welcher wiederum durch den Mikrocontroller angesteuert wird. Das Licht der LED wird über einen 10% reflektierenden Strahlteiler in den zum Auge führenden Strahlengang gelenkt. Diesen Strahlteiler passieren im Anschluss 90% des vom Auge rückgestreuten Lichts in Richtung der Kamera. Bei Verwendung der Autofluoreszenzbeleuchtung gehen aufgrund des Strahlteilers auch 10% des emittierten Fluoreszenzsignals verloren, welche in Richtung der LED reflektiert werden.

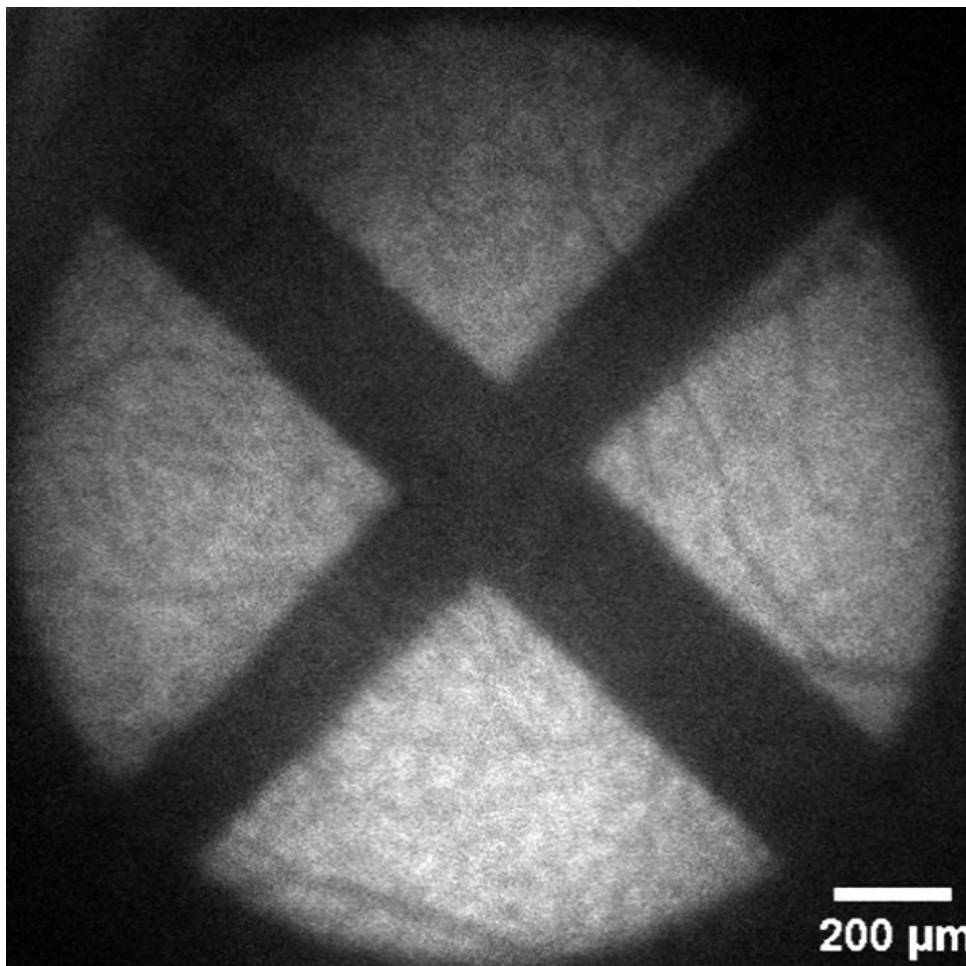


Abbildung 5.15: Kalibrationsbild mit Streulichtbeleuchtung des Auges einer 30-jährigen Testperson.

5.3.2.7 Kamera

Als Kamera für das System wird eine gekühlte CCD-Kamera verwendet (PCO Sensicam qe). Sie besitzt bei einer Wellenlänge von 630 nm eine Quanteneffizienz von ungefähr 50 %. Das Ausleserauschen hat eine Standardabweichung von 4 bis 5 Elektronen und das

Dunkelstromrauschen ist aufgrund der Kühlung auf -12°C vernachlässigbar gering ($0,1 e^{-}/s$). Die Kamera besitzt 1376 mal 1040 Pixel mit einem Pixelabstand von $6,45 \mu\text{m}$. Eine für den realisierten Aufbau notwendige Eigenschaft der Kamera ist die Möglichkeit, die Aufnahmezeitpunkte extern zu triggern. Dies geschieht über einen TTL-Eingang über eine BNC-Buchse an der Controllerkarte der Kamera, welche sich in einem PCI-Steckplatz des Computers befindet.

5.3.2.8 Optischer Aufbau

Der optische Aufbau ist so konzipiert, dass der Abbildungsstrahlengang über weite Strecken parallel verläuft. Dieser parallele (unendlich-)Strahlengang wird jeweils mit Linsen auf die Kamera, das LCD, die Kalibrierungsstruktur und das Auge fokussiert. Der Beleuchtungsstrahlengang ist in Abbildung 5.16 dargestellt, während Abbildung 5.16 den Bildgebungsstrahlengang zeigt. Am zum Auge zeigenden Ende des Strahlengangs befindet sich ein System aus zwei Linsen. Dieses System stellt praktisch eine Strahlaufweitung dar. Die von dem Auge weiter entfernte Linse lässt sich entlang der optischen Achse verschieben, um den Fokus auf dem Augenhintergrund einzustellen.

Die vor dem μLCD befindliche Strahlaufweitung lässt das Licht divergent auf dieses treffen. Für einen herkömmlichen Mikroskopaufbau würde man hingegen den Strahl parallel eingestellt (auf unendlich fokussiert) auf den SLM lenken. Eine solche Strahlführung würde jedoch zu einer Fokussierung des Beugungsbildes des Beleuchtungsmusters innerhalb des Augapfels führen. Somit ergäben sich im Glaskörper einzelne Punkte mit sehr hoher Lichtintensität. Auch wenn im Rahmen von ISO 15004-2:2007 der Glaskörper nicht als potentiell zu schädigendes Gewebe angesehen wird, also keine Gefährdungsberechnung für den Glaskörper vorgesehen ist, ist die Fokussierung des Laserstrahls innerhalb des Augapfels aufgrund der hohen eingestrahnten Lichtleistung zu vermeiden. Durch die realisierte Strahlführung mit divergenter Aufweitung verläuft das Licht innerhalb des Auges annähernd parallel, womit eine Schädigung des Glaskörpers ausgeschlossen werden kann.

Im Anregungsstrahlengang befindet sich eine Aperturblende (Ordnungsblende in Abbildung 5.16) vor dem Strahlteiler in der Nähe des Beugungsbildes des LCD. An dieser Stelle werden die Beugungsordnungen des Pixelgitters abgeschirmt, während die im Vergleich weniger stark abgelenkten Ordnungen des auf dem LCD dargestellten Musters transmittiert werden.

Um die astigmatische Aberration der untersuchten Augen zu korrigieren, können zylindrische Brillengläser vor der vordersten Linse des Gerätes im Bereich unmittelbar vor dem Auge des Probanden angebracht werden. In der Augenklinik gibt es Korrekturlinsen zur herkömmlichen manuellen Visusvermessung. Diese Linsen können auf einem Brillengestell angebracht werden, um zu überprüfen, welche Linsenkombination den besten Visus

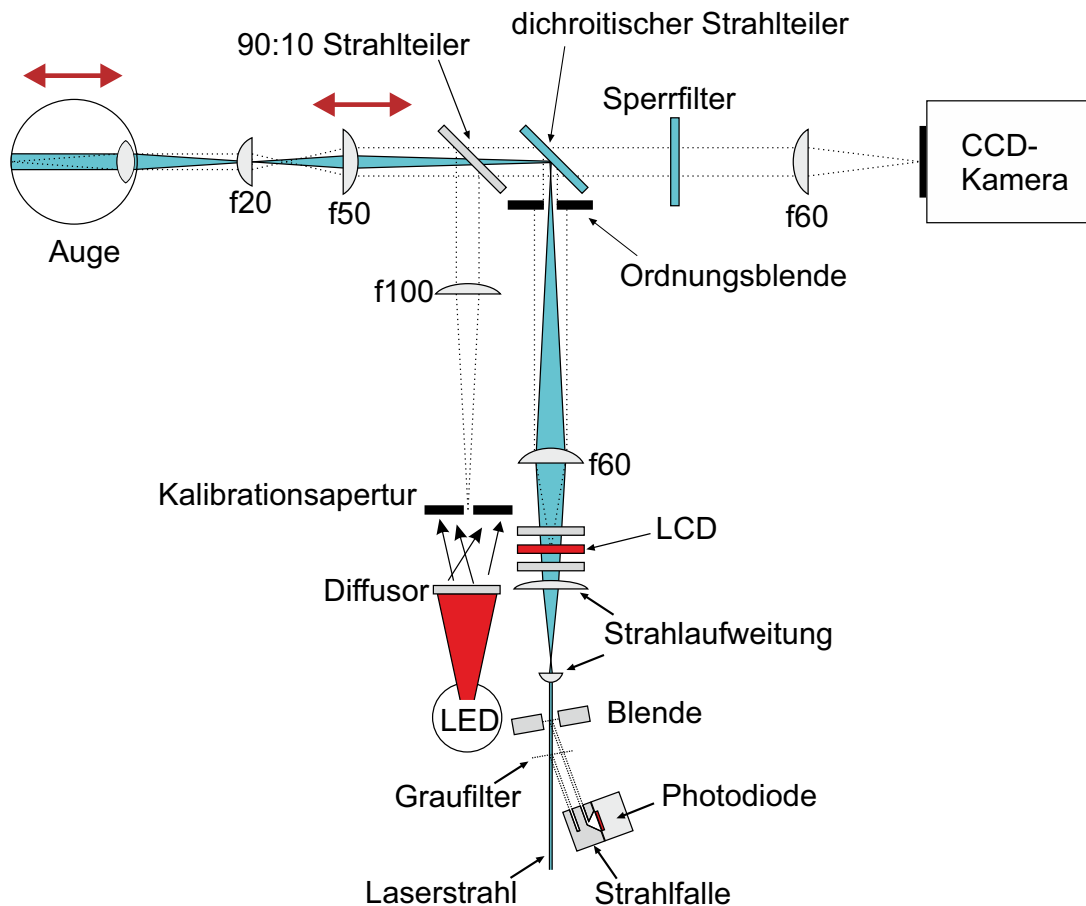


Abbildung 5.16: Schema des optischen Aufbaus des Ophthalmoskops mit Darstellung der Laserbeleuchtung. Der Laserstrahl verlässt die Strahlauflerung divergent. Hierdurch wird erreicht, dass der Strahl innerhalb des Auges parallel verläuft. Das LCD zur Darstellung des Gitters befindet sich in einer konjugierten Bildebene. Während die Laserblende geöffnet ist und somit das Auge bestrahlt wird, trifft kein Licht auf den Photodetektor an der Strahlfalle.

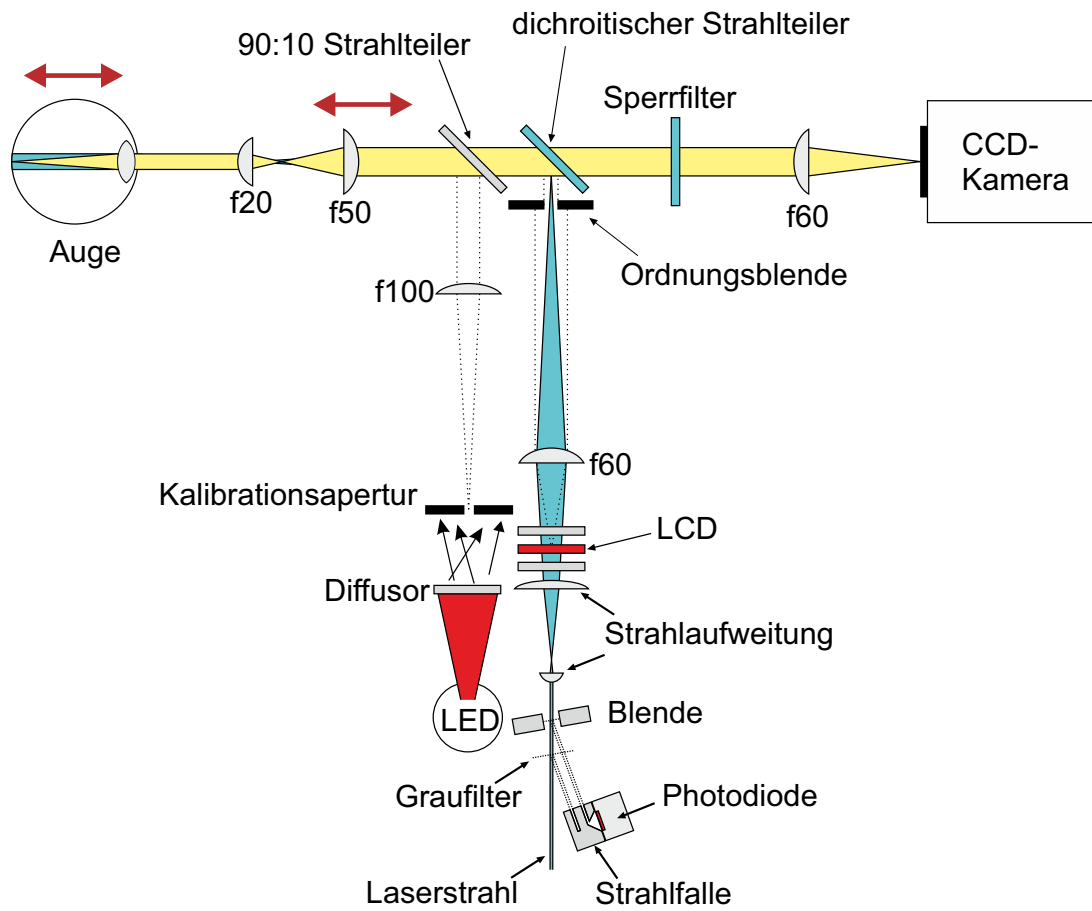


Abbildung 5.17: Schema des optischen Aufbaus des Ophthalmoskops mit Darstellung des Detektionsstrahlengangs. Das Licht eines Punktes im Augenhintergrund verläuft nach Durchlaufen der beiden ersten Linsen von links zunächst parallel, bevor es von der Abbildungslinse auf den Kamerachip fokussiert wird.

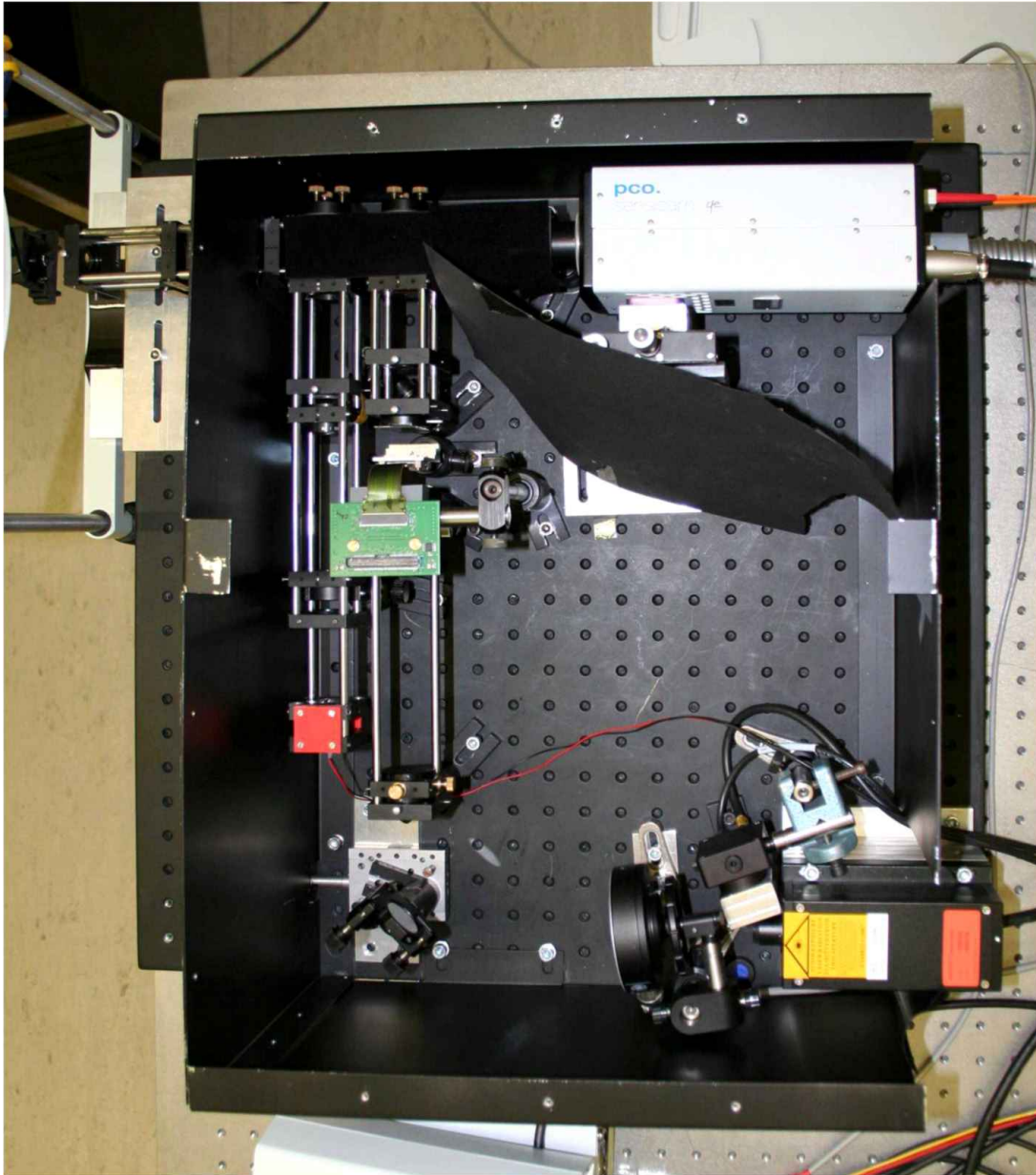


Abbildung 5.18: Fotografie des Ophthalmoskopaufbaus. Unten rechts befinden sich Laser, Blende, Strahl-
falle und Photodetektor. Oben rechts ist die Kamera zu sehen, oben links das Kunstauge.

ergibt. Die Korrekturlinsen sind in feiner Abstufung in 0,2 dpt Schritten für die zylindrische Korrektur verfügbar. Florian Schock fertigte eine Halterung, auf welche die Linsen aufgesteckt werden können.

Da die Linsen nicht über eine entspiegelnde Beschichtung verfügen, erschweren sie die Fokuskorrektur mithilfe der Reflexionsbeleuchtung beträchtlich, da ein Teil des Lichts in Richtung der Kamera zurückreflektiert wird. Daher müssen diese Linsen für die Justage entfernt und lediglich für die Autofluoreszenzbeleuchtung eingesetzt werden.

Im Rahmen der klinischen Studie stellte sich heraus, dass das häufige Wechseln der Linsen einen hohen Aufwand darstellte. Da sich der Kopf der Probanden in einem gewissen Maß zwischen den Aufnahmen bewegte, musste regelmäßig die Reflexionsbeleuchtung verwendet werden, um das Auge bzw. den Kopf wieder neu zu positionieren, wozu jeweils die Linse entfernt werden musste. Aus diesem Grund wurde die Linsenhalterung wieder entfernt und die Probanden mit Astigmatismus wurden stattdessen gebeten, ihre Brille während der Untersuchung zu verwenden, was problemlos funktionierte.

Um die zu beobachtende Region im Augenhintergrund zu verfahren, muss der Proband seine Blickrichtung ändern. Zum Lenken und zur Fixierung der Blickrichtung kann auf das andere Auge zurückgegriffen werden, da beide Augen auf den selben Punkt fixiert sind. Diese Verwendung eines Referenzpunktes ist in der Ophthalmoskopie gängige Praxis. Florian Schock besorgte hierfür eine kleine LED-Beleuchtung mit langem, biegbarem Schwanenhals und befestigte sie am Ophthalmoskop (zu sehen in Abbildung 5.22).

Der gesamte Aufbau wurde mit einem Gehäuse aus Aluminiumblech umschlossen. Das Blech wurde beidseitig mit schwarzer Farbe lackiert.

5.3.2.9 Software

Die Software des Mikrocontrollers wurde in C++ geschrieben unter Verwendung der Arduino Entwicklungsumgebung. Zur Ansteuerung des Mikrocontrollers, des μ LCD und der Kamera über den PC wurde für die Experimente mit dem Kunstage (5.3.3) das auf der Programmiersprache Java basierende Bildbearbeitungsprogramm ImageJ verwendet. Für dieses Programm war bereits eine Erweiterung zur Ansteuerung der Kamera verfügbar. Die Geräteansteuerung wurde in Form von in Java geschriebenen (objektorientierten) Skripten durchgeführt, welche in ImageJ ausgewählt werden konnten. Die verschiedenen Gitter für das μ LCD wurden im Rahmen dieser Skripte ebenfalls über den DVI-Ausgang ausgegeben. Für die Anwendung des Gerätes an Probanden musste allerdings eine Software mit anwenderfreundlicher und einfach gestalteter grafischer Oberfläche erstellt werden, die speziell auf die klinische Studie angepasst sein sollte und damit auch zur Bedienung durch fachfremdes Personal geeignet sein musste. Bei der Erstellung dieser Software war Andreas Weber, ein an der Fachhochschule Offenbach angestellter Wissenschaftler, im

Rahmen einer Kooperation behilflich. Herr Weber war mit seinen sehr guten Programmierfähigkeiten in der Lage, innerhalb weniger Tage die gesamte, auf C++ basierende Software zu schreiben, womit er eine große Hilfe war. Die grafische Benutzeroberfläche der Software ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Die zu verwendenden Gittereinstellungen werden in ein Textdokument eingetragen, welches dann von der Software eingelesen wird.

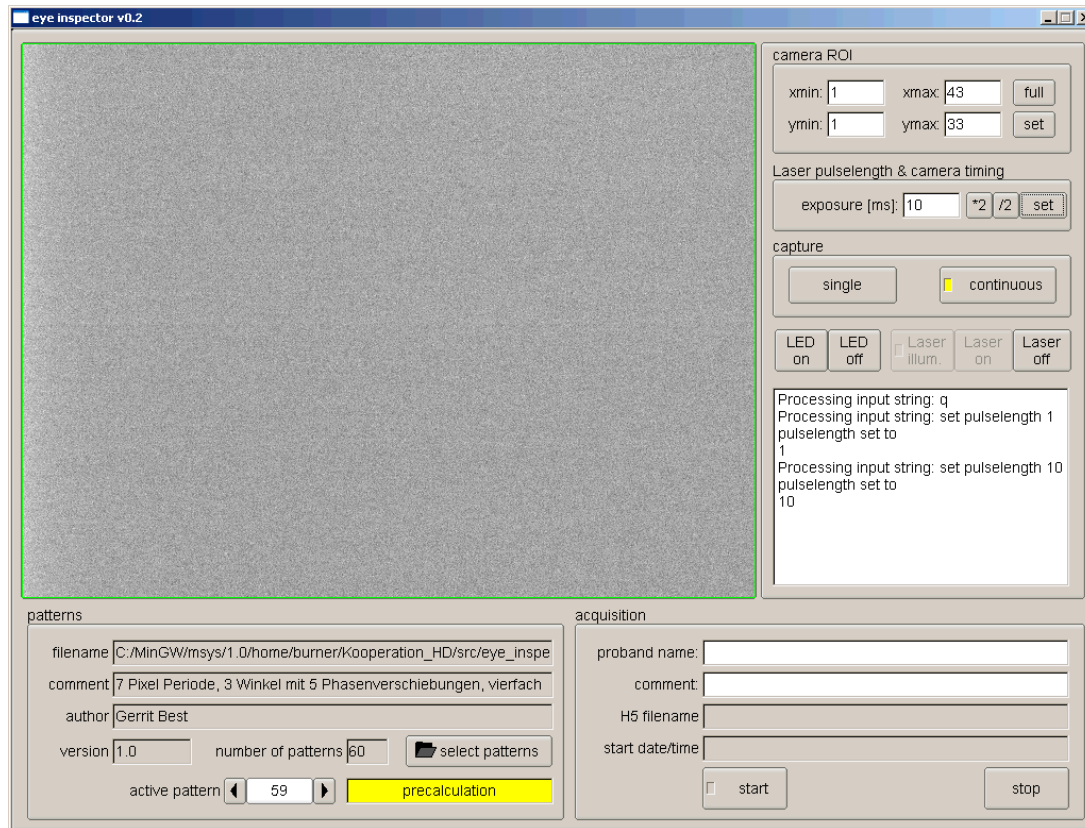


Abbildung 5.19: Grafische Benutzeroberfläche der *eye inspector* Software des Ophthalmoskops.

5.3.2.10 Kopfstütze zur Fixierung der Probanden

Um den Augenhintergrund eines Probanden zu untersuchen, ist es erforderlich, dass das Auge mit einer Genauigkeit im Rahmen von etwa einem Millimeter fixiert wird. Kommerzielle Systeme verfügen hierzu über eine Kopfstütze auf welcher der Proband sein Kinn ablegen kann. Ein weiterer Fixierungspunkt ist hierbei eine diagonal verlaufende Strebe oder Lasche auf Höhe der Stirn. Der Kopf ist durch diese Stützte nur begrenzt fixiert und die genaue Justage wird in Echtzeit vom untersuchenden Arzt bzw. dem Arzthelfer durch Bewegen des Ophthalmoskops vorgenommen. Kommerzielle Systeme sind zu diesem Zweck nicht fix gelagert, sondern können durch Hebel stufenlos eingestellt werden, während zusätzliche Optik dem Arzt die Vorderseite des Auges mit einer Art Fadenzug als Anhaltspunkt darstellt. Für das Ophthalmoskop war eine derartige Vorrichtung aufgrund der Ausmaße und Masse des Gerätes und der zur Verfügung stehenden Mittel nicht zu realisieren. Daher war es erforderlich den Kopf des Probanden überaus stabil

zu fixieren. Aus diesem Grund wurde eine Kopfstütze eines zur Behandlung von Augen mit Röntgenstrahlung vorgesehenen Gerätes angeschafft. Mark Shusterman, klinischer Direktor von Oraya Therapeutics (Newark, CA, USA) konnte freundlicherweise eine Kopfstütze eines nicht mehr verwendeten Prototypen kostenlos zur Verfügung stellen. Diese Kopfstütze ist im Vergleich zu Kopfstützen herkömmlicher Ophthalmoskope sehr stabil konstruiert. Zudem verfügt sie über eine Spannvorrichtung, welche an den Hinterkopf drückend den Kopf an der Stirnlasche fixiert.

5.3.2.11 Kosten des erstellten Gerätes

Eine Auflistung der Komponenten des Ophthalmoskops ist im Anhang zu finden A.6. Da bereits einige Komponenten aus dem Bestand vorhanden waren (Kamera, Breadboard, Linsen, Optomechanik), wird die Rechnung einmal ohne diese Teile aufgestellt und einmal mit äquivalentem Ersatz.

Hiermit kommt man ohne die bereits vorhandenen Teile auf Bruttokosten in Höhe von etwa 6800 Euro brutto.

Rechnet man die Kosten für äquivalenten Ersatz für die vorhandenen Gerätschaften hinzu, ergibt sich ein Gesamtbetrag von knapp 19000 Euro brutto.

5.3.3 Voruntersuchungen am Kunstauge

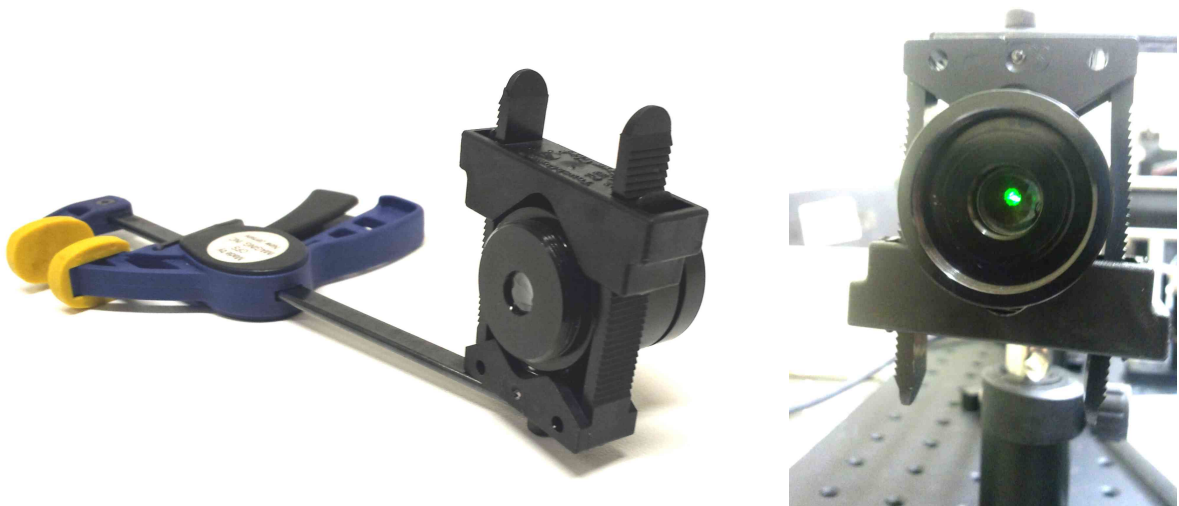
Zur Überprüfung des Ophthalmoskops während der Phase der Erstellung des Aufbaus wurde ein Kunstauge (Test Eye, DARC, Great Neck, NY, USA) verwendet (Abbildung 5.20). Dieses tubusförmige Testauge wurde für Kalibrationszwecke von ophthalmologischen Instrumenten erstellt. In der Frontfläche befindet sich eine Linse mit einer freien Apertur von 8mm , deren Brennweite der eines menschlichen Auges nachempfunden ist (22mm). Die Bild-, bzw. Objektebene ist durch ein Gewinde mit dem Tubus verbunden. Durch Rotieren dieses Bauteils lässt sich die Position der Ebene entlang der optischen Achse verschieben, um somit kurzsichtige (langer Augapfel) oder weitsichtige (kurzer Augapfel) Augen zu simulieren. Zu beachten ist, dass die Linse des Kunstauges im Gegensatz zu einem typischen menschlichen Auge praktisch keine Aberrationen aufweist. Daher ergibt sich durch das Kunstauge eine Abbildungsqualität, die der eines perfekten Auges entspricht.

Für die Verwendung des Kunstauges zur Kalibrierung des Ophthalmoskops wurde dieses leicht modifiziert. Die hintere Ebene wurde zentral durchbohrt mit einem Durchmesser von 10mm sodass das eingestrahlte Licht das Auge auf der Rückseite verlässt um zu verhindern, dass an der Rückfläche reflektiertes Licht die Bildgebung beeinflusst (siehe Abbildung 20(b)).

Auf die Innenseite der Rückfläche wurden verschiedene Proben aufgebracht (fluoreszierende Kalibrationspartikel, Skala zur Bestimmung des Abbildungsmaßstabes, fixiertes menschliches RPE-Gewebe aus einem Spenderauge). Die Proben wurden hierzu zwischen zwei kreisförmige Deckgläser geklemmt, welche dann am Hintergrund des Kunstauges befestigt wurden.

Mit dem Kunstauge wurde flächig präpariertes mit Paraformaldehyd (PFA) fixiertes menschliches Gewebe des Augenhintergrundes abgebildet. Das Gewebe wurde hierzu kreisförmig ausgestanzt und ohne die Retina mit dem RPE als vorderste Schicht zwischen zwei Deckgläser geklemmt. Als Einbettmedium wurde SlowFade Gold (Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die Probe wurde am Rand mit Nagellack versiegelt. An den Resultaten dieser Aufnahmen (Abbildung 5.21) ist deutlich der bildverbessernde Effekt der strukturierten Beleuchtung im Vergleich zum Weitfeldbild zu erkennen. Zum einen ist die laterale Auflösung erhöht, während zum anderen durch die optische Schnittbildung entlang der optischen Achse der Kontrast deutlich verbessert ist.

Zu beachten ist die Tatsache, dass bei der Bildgebung durch das Kunstauge durch das Fehlen von starken Aberrationen und aufgrund der Entfernung der Netzhaut die erhaltene Bildqualität deutlich höher ist, als es bei einem natürlichen Auge möglich wäre. Die Entfernung der Netzhaut bei fixierten Präparaten ist erforderlich, da abgestorbenes



(a) Das Kunstauge wurde mit einer Klemmvorrichtung geliefert mit welcher dieses an der Kopfstütze des Ophthalmoskops befestigt werden kann.

(b) Ein Teil des eingestrahelten Lichts verlässt das Kunstauge durch die rückseitige Öffnung.

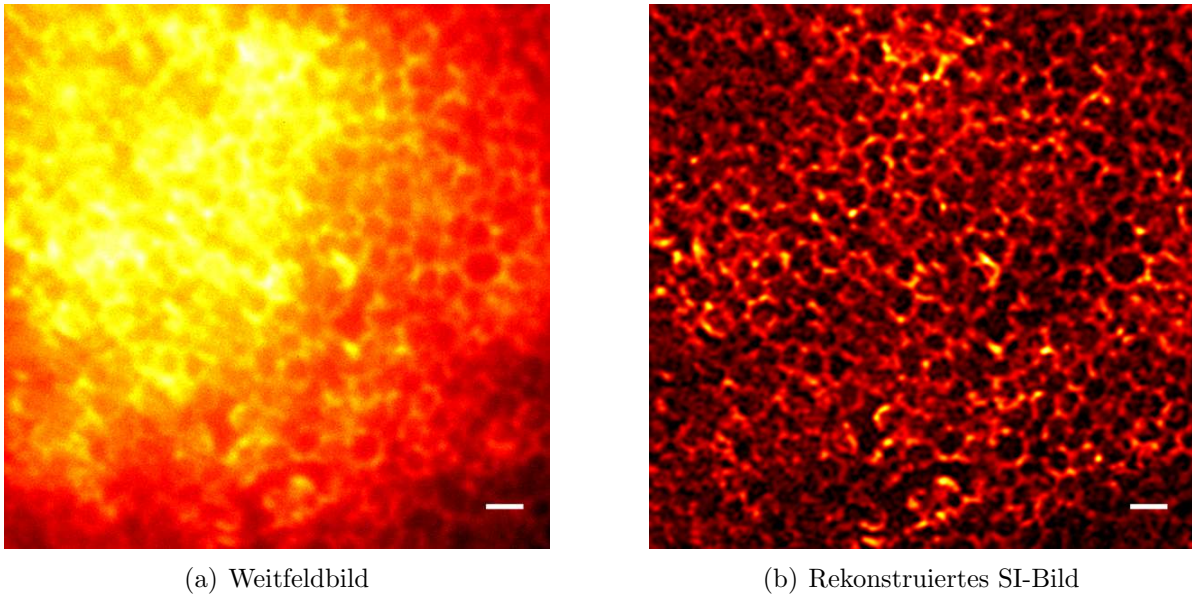
Abbildung 5.20: Kunstauge

Netzhautgewebe seine optische Transparenz verliert und damit die Untersuchung dahinterliegender Schichten verhindert. Dieser Effekt tritt rasch auf, wenn die Retina nicht mehr durchblutet wird, was nach der Entnahme des Auges der Fall ist. Bei der Fundusfotografie am lebenden Auge bei Probanden mit Netzhautischämie (Minderdurchblutung der Netzhaut) sind die betroffenen Bereiche als weiße Flecken zu erkennen.

Die Untersuchung des Frequenzspektrums der rekonstruierten Aufnahme ergibt eine Auflösung von $1,6\mu\text{m}$. Hierdurch ist die wabenförmige Anordnung der RPE-Zellen deutlich zu erkennen. Bei einem menschlichen Auge mit vorhandener Netzhaut inklusive der Photorezeptorenschicht wäre eine derart hochauflösende Bildgebung allerdings nicht möglich (siehe Kapitel 4.4.5.2). Zur Aufnahme der in Abbildung 5.21 dargestellten Bilder wurde eine Vergrößerung von 8,78 verwendet. In der klinischen Studie betrug die Vergrößerung hingegen lediglich 1,90 was einem Pixelabstand der Kamera, projiziert auf die Objektebene, von 3,40 entspricht.

5.3.4 Die klinische Studie

Um das Ophthalmoskop an Probanden anwenden zu können, wurde am 22.10.2013 über das DIMDI (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information) bei der Ethikkommission Heidelberg (Alte Glockengießerei 11/1, 69115 Heidelberg) ein Antrag auf eine klinische Studie nach dem Medizinproduktegesetz (MPG) angemeldet. Die zuständige Behörde für die Studie ist das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, 53175 Bonn).



(a) Weitfeldbild

(b) Rekonstruiertes SI-Bild

Abbildung 5.21: Aufnahme von flächig präpariertem RPE am Ophthalmoskop durch das Kunstauge. Das rekonstruierte Bild der Aufnahme mit strukturierter Beleuchtung (b) zeigt deutlich die wabenförmige Anordnung der RPE-Zellen. Das Weitfeldbild (a) hat eine geringere Auflösung und einen schlechteren Kontrast. Zu beachten ist, dass die Netzhaut abpräpariert wurde und dadurch eine Bildgebung des RPE mit einer Auflösung von etwa $1,6 \mu\text{m}$ möglich wurde. Ebenfalls verursacht die Glaslinse des Kunstauges keine starken Aberrationen. Zur Darstellung des Grauwertbildes wurde die Falschfarbendarstellung „hot“ verwendet. Der Maßstabsbalken besitzt eine Länge von $20 \mu\text{m}$.

Als ophthalmisches diagnostisches Instrument, welches Licht in das Auge richtet, muss das Ophthalmoskop zusätzlich zu generellen Medizinproduktenormen die geltende Norm ISO 15004-2:2007 (Ophthalmische Instrumente – Grundlegende Anforderungen und Prüfverfahren – Schutz gegen Gefährdung durch Licht) einhalten. Diese Norm enthält eine Reihe von Prüfverfahren und Berechnungsregeln, um die Gefährdung durch ein ophthalmisches Medizinprodukt zu bewerten. Nach ISO 15004-2:2007 wird grundsätzlich zwischen zwei Klassen von Geräten unterschieden:

- Instrument der Gruppe 1
Ophthalmische Instrumente, von denen keine mögliche Gefährdung durch Licht ausgeht.
- Instrument der Gruppe 2
Ophthalmische Instrumente, von denen möglicherweise eine Gefährdung durch Licht ausgeht.

Instrumente beider Gruppen können für die Anwendung am Menschen zugelassen werden. Bei Instrumenten der Gruppe 2 müssen allerdings zusätzliche Auflagen erfüllt sein (z.B. muss Sorge getragen werden, dass das Auge nicht über einen zu langen Zeitraum bestrahlt wird). Die Berechnungen werden hierbei in der Regel separat für die photochemische

Gefährdung und für die Gefährdung durch Erwärmung des Gewebes durchgeführt. Es gibt hierzu sowohl für den vorderen Augenabschnitt, als auch für den Augenhintergrund spezielle Berechnungsschlüssel. Das Ophthalmoskop mit strukturierter Beleuchtung erfüllt die Anforderungen für ein Instrument der Gruppe 1 und ist hiermit formell entsprechend der Definition ungefährlich. Kommerzielle SLO-Systeme sind hingegen in der Regel in Gruppe 2 einzuteilen, was zum einen an der schädlicheren verwendeten Wellenlänge von 488 nm und zum anderen an der potentiell gefährlicheren fokussierten Bestrahlung des Augenhintergrundes liegt. Bei fokussierter Beleuchtung des Auges resultiert beispielsweise ein Ausfall der Scanningvorrichtung unmittelbar in einer Schädigung des Auges, solange dies nicht zu einer raschen Unterbrechung des Lasers führt.

Die Sicherheitsabschaltung des Ophthalmoskops mit strukturierter Beleuchtung ist daher streng genommen nicht notwendig, da auch bei längerandauernder Beleuchtung des Auges die Grenzwerte für Instrumente der Gruppe 1 nach ISO 15004-2:2007 nicht überschritten werden. Die Berechnungen entsprechend ISO 15004-2:2007 sind im Prüfplan der klinischen Studie zu finden [79], welcher auf Anfrage erhältlich ist.

Die Bewertungsfunktionen basieren im Wesentlichen auf Erkenntnisse, welche in Tierversuchen gewonnen wurden. Die in der Norm vorgegebenen Berechnungsrichtlinien sind allerdings recht abstrakt und physikalisch nicht immer nachvollziehbar. Aus diesem Grund wurden die gemessenen Intensitätswerte zusätzlich mit im Alltag auftretenden Orientierungswerten verglichen.

Eine häufige Ursache für thermische Schädigung des Auges im Alltag ist das direkte Starren in die Sonne über einen Zeitraum von mehreren Sekunden. Das Abbild der Sonne auf dem Augenhintergrund hat hierbei eine Intensität von etwa 9 W/cm^2 . Die durch das Ophthalmoskop im Auge erzeugte Intensität beträgt (zuzüglich Messungenauigkeit) $0,102\text{ W/cm}^2$ und liegt damit fast zwei Größenordnungen unter diesem Wert, was nach ISO 15004-2:2007 sogar bei Dauerbeleuchtung keine Gefährdung durch Erwärmung darstellt. Durch die stroboskopische Beleuchtung des Instrumentes findet jedoch nur etwa während $1/10$ der Aufnahmezeit die Beleuchtung statt, was den relativen Wert im zeitlichen Mittel erneut um eine weitere Größenordnung reduziert.

Die photochemische Gefährdung ist im Allgemeinen schwieriger zu beurteilen als die thermische. Zum Vergleich wurde die photochemisch korrigierte Lichtenergie pro Fläche herangezogen, die während des Lesens in der Mittagssonne im Augenhintergrund deponiert wird. Als Bewertungsfunktion wurde der in Abbildung 5.11 dargestellte Verlauf verwendet. Im Resultat ist die photochemische Schädigung durch eine Aufnahme geringer als die Schädigung, welche während des Lesens im Sonnenlicht innerhalb einer Minute hervorgerufen wird.

Auch wenn die Berechnungen dem Ophthalmoskop keine Gefährdung nachweisen, sollte

in jedem Fall versucht werden, die verwendete Intensität und die Anzahl der Aufnahmen so klein wie möglich zu halten. Immerhin handelt es sich um eine äußerst unnatürliche Belastung des Auges und das Auge ist evolutionär lediglich auf die Schädigung durch Sonnenlicht ausgelegt. Monochromatisches Licht existiert in der Natur kaum (nur durch Lumineszenz, Streuung, Beugung und Brechung jeweils in sehr geringem Ausmaß).

Für die Beantragung einer klinischen Studie muss das Prüfprodukt auch hinsichtlich der Medizinproduktklasse eingeteilt werden. Aufgrund der vorgesehenen Anwendung und der verwendeten Strahlung (ausschließlich sichtbarer Spektralbereich) wäre sogar eine Einteilung in die niedrigste Klasse I möglich. Bei der Einteilung wurde aber eine Orientierung an Vergleichsprodukten (Scanning-Laser-Ophthalmoskope) vorgenommen um keine unverhältnismäßig niedrige Einteilung zu bewirken (Klasse I umfasst für gewöhnlich passive Gegenstände wie etwa Betten oder Gehhilfen) woraus eine Einteilung in Klasse IIa resultierte. Als Klasse IIa eingeteilt sind in der Regel alle ophthalmologischen Diagnosegeräte, die Licht in das Auge richten und allgemein wenig schädliche aktive Diagnosegeräte wie zum Beispiel Ultraschallgeräte.

Bei der Beantragung von klinischen Studien für Medizinprodukte mit geringem Sicherheitsrisiko der Klasse IIa besteht die Möglichkeit, beim BfArM eine Befreiung von der Genehmigungspflicht zu beantragen, was bei Genehmigung den Entfall einer persönlichen Prüfung durch die Behörde oder einen externen Gutachter bewirkt. Hierzu muss unter anderem eine detaillierte Risikoanalyse dem BfArM übermittelt werden, welche dort geprüft wird. Die Befreiung von der Genehmigungspflicht für die Studie wurde am 03.04.2013 beantragt und am 16.05.2013 durch das BfArM genehmigt.

Für die Beantragung der klinischen Studie bei der Ethikkommission Heidelberg war zusätzlich die Erstellung einer Vielzahl weiterer Dokumente erforderlich, deren Prüfung dem Koordinierungszentrum für klinische Studien (KKS) Heidelberg oblag. Eine Probandenversicherung, die im Ernstfall die Verantwortung für eine finanzielle Entschädigung trägt, ist ebenfalls für die Durchführung einer MPG-Studie erforderlich und wurde demnach abgeschlossen.

Nachdem die Ethikkommission die Studie am 10.12.2013 bewilligt hatte und daraufhin die letzten organisatorisch erforderlichen Schritte (Eintragung in ein internationales Zentralregister, etc.) durchgeführt waren, wurde mit der Rekrutierung der Probanden und mit der Untersuchung begonnen.

Das Ophthalmoskop wurde für die klinische Studie in den Laserraum der Augenklinik in der Kopfklinik des Universitätsklinikums Heidelberg transportiert. Das *breadboard* mit dem Aufbau wurde auf einem höhenverstellbaren Tisch platziert. Der Stuhl, auf dem die Probanden Platz nehmen können, ist ebenfalls höhenverstellbar. Abbildung 5.22 zeigt den Versuchsaufbau in der Augenklinik.

Vor der Anwendung des Ophthalmoskops wird eine Reihe von Voruntersuchungen durchgeführt. So werden Netzhautfotografien angefertigt, die Brechungsaberrationen niedriger Ordnung werden mit einem Autorefraktometer gemessen und zu Vergleichszwecken werden Autofluoreszenzaufnahmen mit einem SLO angefertigt.

Für die Untersuchung werden pupillenerweiternde Augentropfen (Mydriatika) verabreicht um die Pupillenreaktion (das Schließen der Pupille in Reaktion auf erhöhten Lichteinfall) während der Untersuchung zu unterbinden.

Um strukturiert beleuchtete Daten rekonstruieren zu können, benötigt man bei Dreistrahlinterferenz fünf Einzelbilder mit jeweils unterschiedlich verschobenen Beleuchtungsmustern. Bei Aufnahmen an einem lebenden Auge sind die relativen Verschiebungen des Musters aufgrund der Augenbewegungen nicht vorhersehbar. Hierdurch kann es vorkommen, dass sich die relativen Gitterverschiebungen nicht hinreichend unterscheiden, um die Ordnungen trennen zu können. Außerdem ist ein Teil der Einzelbilder nicht zu gebrauchen, weil sich eine Mikrosakkade während der Belichtungszeit ereignet hatte oder weil der Proband geblinzelt hatte. Um dennoch in der Regel eine ausreichende Anzahl an Einzelbildern für die Rekonstruktion zur Verfügung zu haben, ist die Bildanzahl pro Gitterorientierung auf 20 eingestellt. Die Gesamtzahl der Einzelbilder für eine Aufnahme beträgt demnach 60 Einzelbilder.

Das Prüfprotokoll sieht vor, dass zunächst mit einem groben Beleuchtungsmuster und einer kurzen Beleuchtungsdauer begonnen wird. Daraufhin wird jeweils die Dauer erhöht, falls das Signal zu schwach war, oder das Muster um eine Stufe feiner eingestellt, falls das Signal ausreichend war. Dieser Optimierungsprozess wird so lange durchgeführt, bis ein noch sichtbares feines Muster mit geeigneter Belichtungszeit bestimmt wurde. Insgesamt werden pro Prüfung 10 Aufnahmen durchgeführt. Ist der Optimierungsprozess vor der zehnten Aufnahme abgeschlossen, können die verbleibenden Aufnahmen mit der optimalen Einstellungen auf verschiedenen Regionen des Augenhintergrundes durchgeführt werden.

Um die Anzahl der erforderlichen Probanden festzulegen, wurde eine Wahrscheinlichkeitsrechnung aufgestellt. Hierzu wurden zunächst die denkbaren einzelnen Gründe für ein Scheitern der Bildaufnahme bei einem Probanden zusammengestellt. Für jeden dieser Gründe (z.B. Abbruch der Studie durch den Probanden, vorher nicht diagnostizierte schwere Hornhautnarben, mangelnde Fixierbarkeit des Probanden) wurde eine Auftrittswahrscheinlichkeit festgelegt. Diese Festlegung basierte auf klinischen Erfahrungswerten (es wurden die beteiligten Ärzte um ihre Einschätzung gebeten). Bei der individuellen Wahrscheinlichkeit der Gründe des Scheiterns wurde hierbei eine Orientierung am oberen Ende der Schätzung vorgenommen.

Diese Einzelwahrscheinlichkeiten wurden als voneinander unabhängig angenommen und

es wurde die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Bildgebung des Auges berechnet. Diese ergab sich unter Verwendung der pessimistischen Schätzung zu 29,8%.

Nun wurde ein Studienerfolg damit definiert, dass es bei mindestens einem Probanden möglich ist, gute (rekonstruierbare) Aufnahmen zu erstellen.

Anhand der Binomialverteilung wurde nun die erforderliche Probandenzahl berechnet, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,73% (entspricht der 3 σ -Regel bei einem normalverteilten Zufallsprozess) einen Studienerfolg zu erreichen, woraus sich eine Fallzahl von 17 ergab.

Da die zugrundeliegende Wahrscheinlichkeitsabschätzung auf subjektiver Basis geschah und es außerdem möglich war, dass Gründe für ein Scheitern übersehen wurden, wurde diese Zahl weiter erhöht auf 25. Ziel dieser Erhöhung war es auch, die Wahrscheinlichkeit der Übererfüllung der Studienerfolgsbedingung zu erhöhen, also mit höherer Wahrscheinlichkeit bei mehreren Probanden gute Bilder zu generieren. Die Berechnung ist im Detail im Studien-Prüfplan [79] zu finden, welcher auf Nachfrage zur Verfügung gestellt wird.

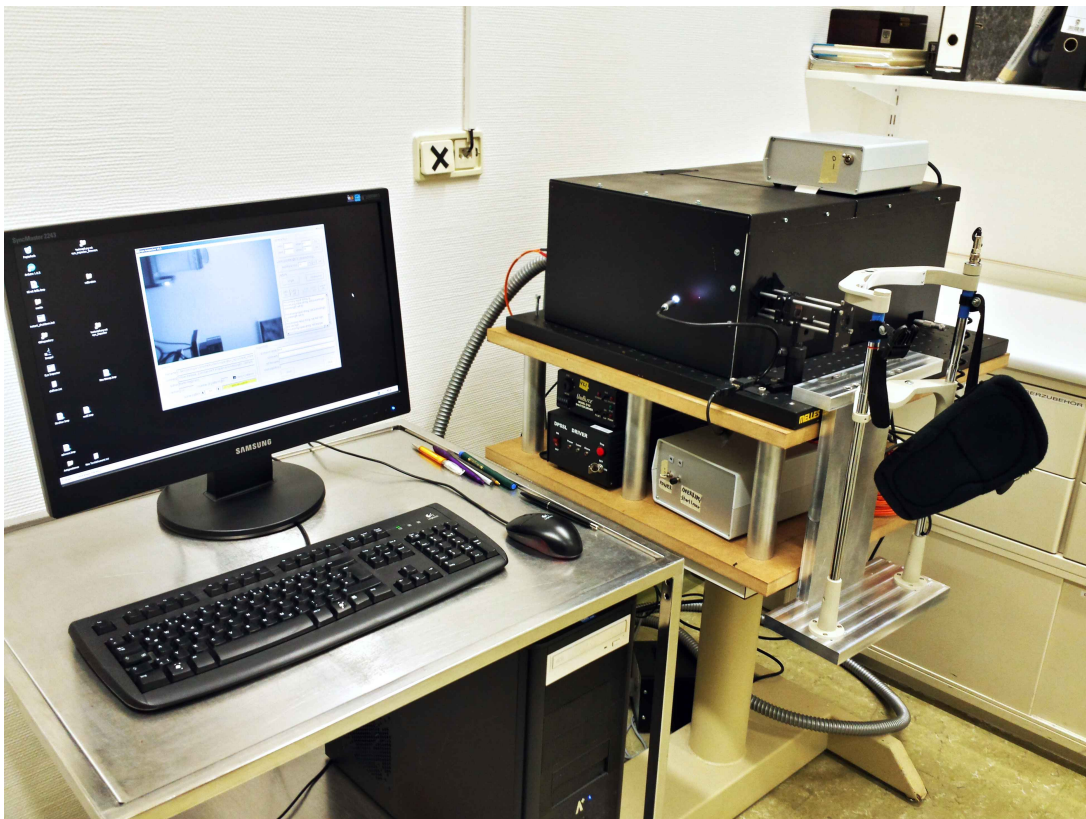
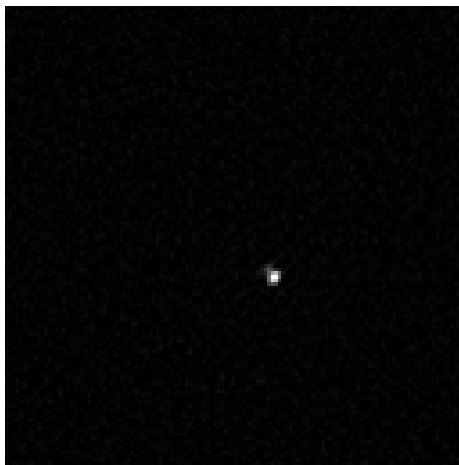


Abbildung 5.22: Die klinische Studie wurde im Laserraum der Augenklinik Heidelberg durchgeführt. Das Ophthalmoskop (rechts) befindet sich auf einem elektromechanisch höhenverstellbaren Tisch. Die an einem Schwanenhals befindliche Beleuchtung zur Blickfixierung ist aktiv. Auf dem Bildschirm des zugehörigen Computer (links) ist die Benutzeroberfläche der Aufnahmesoftware zu sehen.

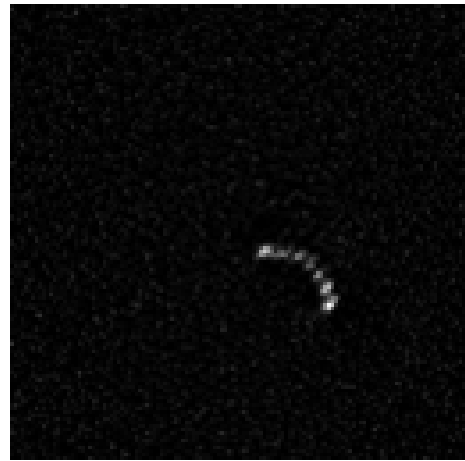
Die Rahmendaten der klinischen Studie sind im Anhang aufgeführt A.5.

5.3.5 Bildrekonstruktion

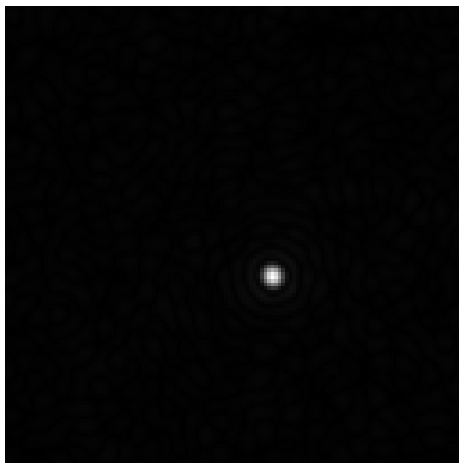
Die mit dem Ophthalmoskop aufgenommenen Bilder einer Aufnahmeserie mit jeweils bis zu 60 Einzelbildern weisen durch die Augenbewegungen relativ zueinander Verschiebungen auf. Um die Daten rekonstruieren zu können, müssen diese Verschiebungen zunächst bestimmt und im Anschluss korrigiert werden. Hierzu wird eine Phasenkorrelation angewandt (siehe Grundlagen 4.1.8). Im Gegensatz zum in den Grundlagen dargestellten Fall, sind diese beiden Bilder nicht identisch, da das zugrundeliegende Objekt jeweils mit dem Beleuchtungsmuster multipliziert wird. Die Position der Beleuchtung relativ zum Objekt ist zudem zunächst unbekannt, da von vornherein nicht klar ist, wo das Objekt positioniert ist. Im Resultat ist der Korrelationspeak mit einer periodischen Funktion moduliert, welche die Wellenvektoren des Gitters besitzt.



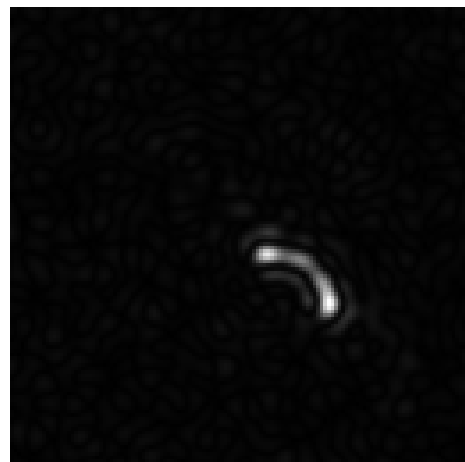
(a) zwei zueinander verschobene Bilder



(b) eines der Bilder erfuhr bei der Aufnahme eine Mikrosakkade



(c) frequenzbegrenzte Phasenkorrelation



(d) frequenzbegrenzte Phasenkorrelation bei Mikrosakkade

Abbildung 5.23: Simuliertes Ergebnis der Phasenkorrelation zur Verschiebungskorrektur

In Abbildung 5.23 ist das simulierte Ergebnis der Phasenkorrelation zueinander verschobener Bilder beim Ophthalmoskop dargestellt. Der Effekt des Multiplikation der periodi-

schen Funktion mit dem Peak lässt sich durch Anwenden eines Tiefpass-Frequenzfilters begrenzen. Auf der rechten Seite ist das zu erwartende Ergebnis einer Mikrosakkade während der Aufnahme dargestellt. Die Verbreiterung des Peaks in der Phasenkorrelation lässt sich erkennen, woraufhin das entsprechende Bild aussortiert werden kann.

Diese Methode, einen Frequenzfilter anzuwenden, begrenzt zwar den Einfluss des Beleuchtungsmusters, korrigiert ihn aber nicht vollends. Ein Frequenzfilter, also das Falten des Bildes, ist nicht geeignet, um die multiplikative Wirkung auf den Peak zu korrigieren. Im Effekt hat das Ergebnis daher einen kleinen *bias* (systematische Abweichung) in Richtung des nächsten Maximums der periodischen Struktur. Dieser Effekt ist allerdings in der Praxis gering. Mit einer *ad-hoc*-Methode ist es nicht möglich, dieses Gitterartefakt korrekt zu entfernen, da das resultierende multiplikative Gittermuster von unbekanntem Faktoren abhängt.

Die Verschiebung der Bilder wird korrigiert. Um den Gittervektor und die Phase des Beleuchtungsmusters zunächst grob zu bestimmen, wird in den Fouriertransformierten der Einzelbilder der Gitterpeak ermittelt und sein Phasenwinkel extrahiert.

Im Anschluss werden die verschiebungskorrigierten Bilder und die grob ermittelten Parameter der frequenzraumbasierten Entfaltung übergeben um das hochaufgelöste Bild zu rekonstruieren.

5.3.6 Beiträge anderer Personen

Bei der Erstellung des Ophthalmoskops und der Beantragung der klinischen Studie waren mir verschiedene Personen behilflich, deren Beitrag ich hiermit darlegen und entsprechend würdigen möchte. Florian Schock (Gruppe Prof. Cremer) konstruierte einen Sockel, um das Ophthalmoskop für die Studie in der richtigen Höhe zu platzieren. Dieser ist in Abbildung 5.22 zu sehen. Des Weiteren erstellte er einen Linsenhalter für die Astigmatismuskorrektur und war mir bei der Erstellung von Unterlagen für die klinische Studie behilflich. Andreas Weber (Fachhochschule Offenbach) entwickelte die Software zur Bedienung des Gerätes im Rahmen der klinischen Studie. Martin Hagmann (Gruppe Prof. Cremer) half ihm bei der Einbindung dieser Software in Heidelberg. Sabrina Roßberger (Gruppe Prof. Cremer) half mir beim Konstruieren und Lackieren des Gehäuses. Die Rekrutierung der Probanden für die Studie wurde durch Nil Celik (Universitätsklinikum Heidelberg, Augenklinik) und Herrn Prof. Stefan Dithmar (Universitätsklinikum Heidelberg, Augenklinik) durchgeführt. Mark Shusterman (Oraya Therapeutics, Newark, CA, USA) stellte eine Kopfstütze zur Fixierung der Probanden zur Verfügung. Für die erfolgreiche Zusammenarbeit möchte ich allen Beteiligten danken.

6 Ergebnisse

6.1 Bildzusammenführung

Die Methode zur Bildzusammenführung wurde an menschlichen RPE-Gewebepräparaten durchgeführt. Die in den Abbildungen gezeigte Probe stammt von einem 68-jährigen Spender. Nach der Entnahme des Auges wurde dieses über einen Zeitraum von 24 h in 4% Paraformaldehyd (PFA) in phosphatgepufferter Salzlösung fixiert. Anschließend wurde die Probe bis zur weiteren Verwendung in zu 1% mit PFA versetzter Salzlösung aufbewahrt. Die makuläre Region wurde mit einem kreisförmigen Stanzmesser aus dem Augenhintergrund extrahiert. Netzhaut und Lederhaut wurden entfernt und der verbleibende RPE-Aderhautkomplex wurde mit SlowFade antifade (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) zwischen mikroskopischem Objektträger und Deckglas eingebettet. Die Präparation wurde von Dr. Thomas Ach an der Augenklinik Heidelberg durchgeführt.

Für die Aufnahme eines großflächigen Bereichs musste am Stück eine große Anzahl einzelner dreidimensionaler Aufnahmen angefertigt werden. Es konnte hierbei nicht riskiert werden, dass eine der Aufnahmen durch Vibrationen des Gebäudes durch umherlaufende Personen beeinflusst wurden (das Labor befindet sich im ersten Stock). Eine wiederholte Aufnahme des selben Bereiches wäre wegen des auftretenden Bleichens der Fluoreszenz problematisch gewesen. Aus diesem Grund wurde die Aufnahmeserie in der Nacht angefertigt. Es wurden 12 (4x3) aneinandergrenzende Bereiche aufgezeichnet. Hierzu wurde für jede Region zunächst eine SIM Aufnahme mit 568 nm Anregungswellenlänge und anschließend eine Aufnahme mit 488 nm angefertigt. Mit geringer Beleuchtungsintensität wurden hierbei die Grenzen der Aufnahme in der z -Richtung manuell bestimmt um nicht unnötige Aufnahmen außerhalb des relevanten Bereichs aufzuzeichnen. Diese manuelle Auswahl war notwendig, weil die Probe Wölbungen aufwies, wie in Abbildung 6.3 zu sehen ist. Zum selben Termin wurden die Kalibrierungsmessungen der Beleuchtungsintensitätsverteilungen für beide Wellenlängen durchgeführt.

Im Anschluss an die Aufnahme wurden die Daten mit der frequenzraumbasierten Methode im Ebene-für-Ebene-Modus (2D) rekonstruiert. Auf diese Daten wurde dann die beschriebene *image-stitching*-Software angewandt.

Da mit zwei Wellenlängen aufgenommen wurde, wurde die genaue Verschiebung der Regionen nur anhand der Aufnahmen mit 488 nm durchgeführt. Die Verschiebungen der Aufnahmen mit 568 nm Anregung wurden jeweils anhand der Aufnahme derselben Region mit 488 nm ermittelt. Die Bleichkorrektur wurde jedoch für beide Wellenlängen separat durchgeführt.

Aufgrund der Besonderheit der Lipofuzinautofluoreszenz war zu erwarten, dass es zu einem gemischtkanaligen Bleichen kommt, dass also eine Aufnahme mit 568 nm ebenfalls

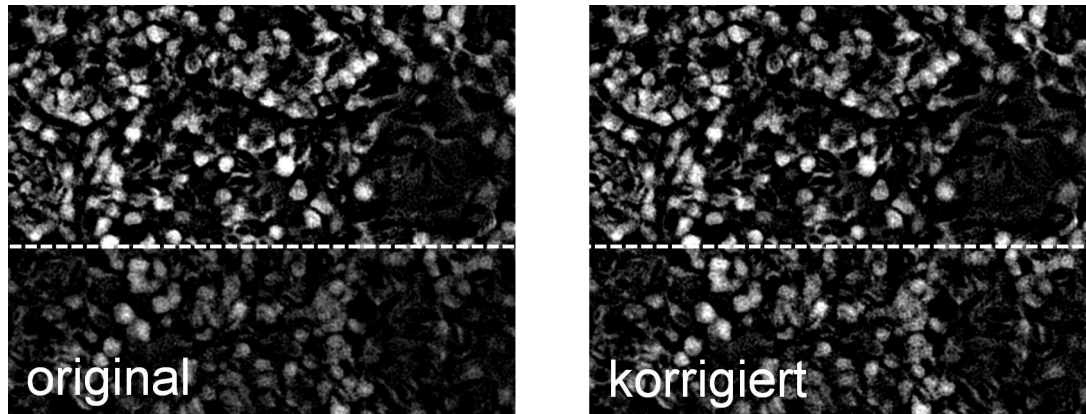


Abbildung 6.1: Effekt der Bleichkorrektur der *image stitching*-Methode. Zwei benachbarte Bilder wurden zur Verdeutlichung mit scharfer Kante (ohne Glättung) aneinandergelegt. Während im unkorrigierten Bild ein deutlicher Helligkeitsverlust im unteren Bild zu erkennen ist, geht diese im korrigierten Bild gleichmäßig über. Dargestellt ist das im 488 nm Kanal aufgezeichnete Signal. Zur Verdeutlichung der Glätte des Übergangs wurde die Linie im korrigierten Bild unterbrochen.

das Bild im 488 nm Kanal ausbleicht. Da allerdings die beiden Laser gut zueinander kollimiert waren und fast identische Strahldurchmesser hatten, hatte dies keinen negativen Einfluss weil das Bleichen als von einem Kanal stammend betrachtet werden konnte. Der Effekt der Bleichkorrektur ist in Abbildung 6.1 verdeutlicht. Ohne die Anwendung der Bleichkorrektur gibt es einen erheblichen Intensitätsverlust zwischen angrenzenden Regionen, während nach der Korrektur kein Unterschied wahrzunehmen ist.

Abbildung 6.2 zeigt einen Schnitt durch den zusammengefügt Stapel des 568 nm Anregungskanal. Da die Zellkerne nicht angefärbt waren, sind sie als kreisförmige Aussparungen der Granulaverteilung zu erkennen. Entlang einer diagonalen Furche ist das Gewebe erhöht, weswegen dort weniger Granula zu erkennen sind. Tatsächlich befinden sich in dieser Region – wie in der dreidimensionalen Ansicht zu erkennen ist (Abbildung 6.3) weniger Granula als im restlichen Volumen.

In der dreidimensionalen Ansicht (6.3) sind die beiden Anregungskanäle zusammengefügt. Das mit 488 nm Anregung aufgezeichnete Bild ist grün dargestellt, das Bild bei 568 nm rot. Während alle Granula in beiden Anregungskanälen fluoreszieren, ist das Verhältnis der Fluoreszenzstärke heterogen.

Das dargestellte zusammengefügte Bild hat ein Volumen von $130 \times 110 \times 20 \mu\text{m}^3$ bei einer Volumenaufösung von $< 0,1 \mu\text{m}^3$.

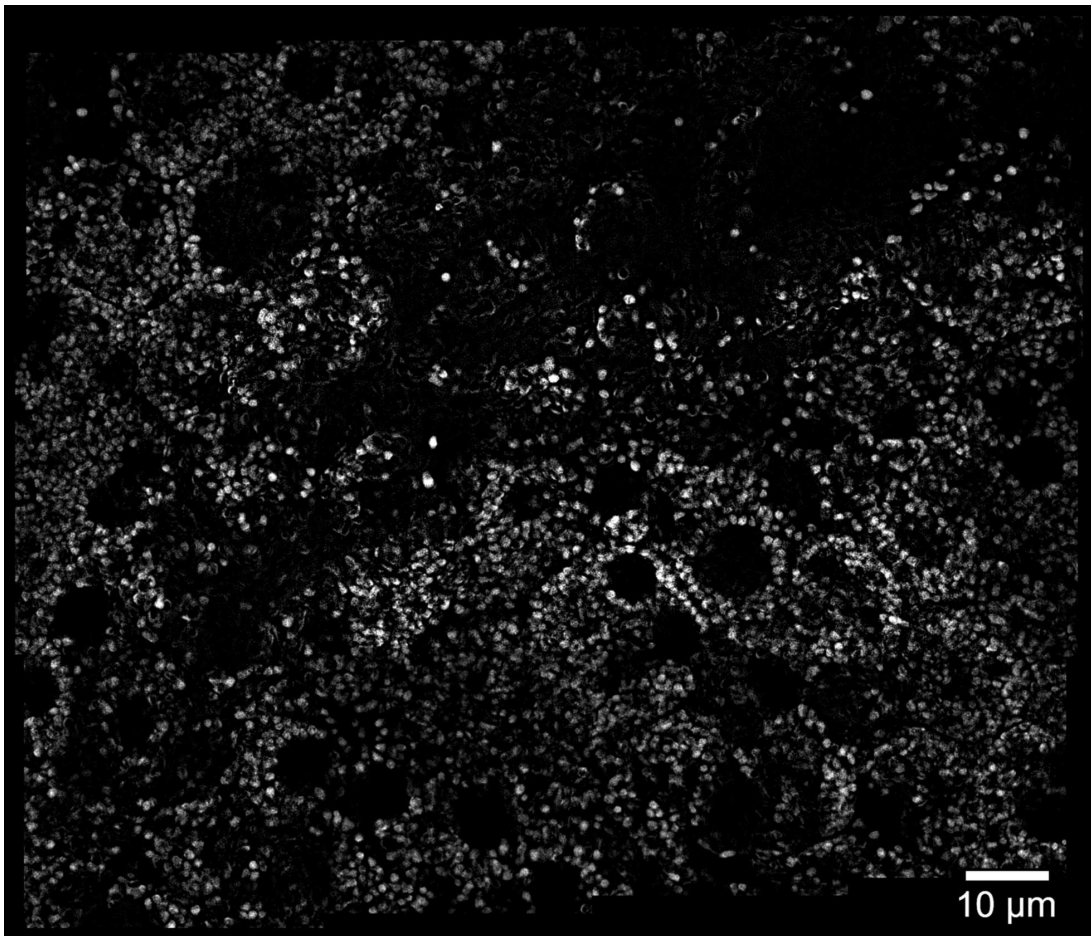


Abbildung 6.2: Schnitt durch das zusammengefügte dreidimensionale Volumen

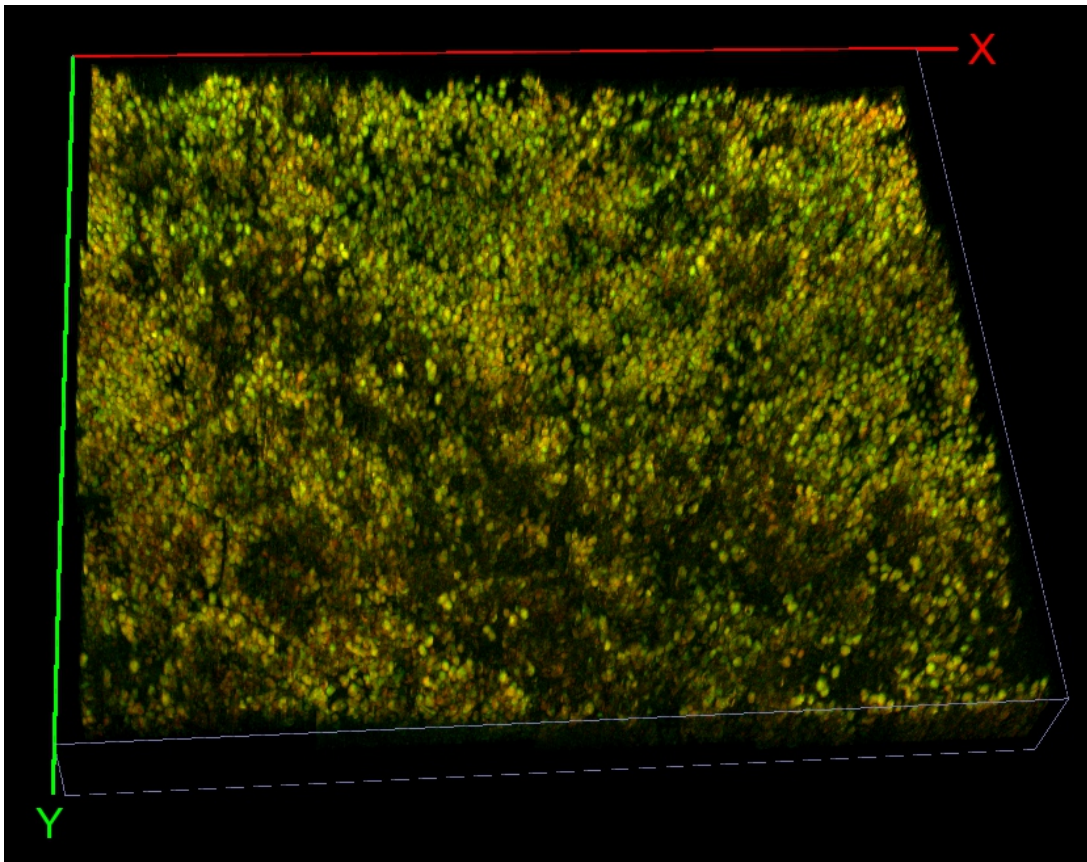


Abbildung 6.3: Dreidimensionale Darstellung des zusammengeführten Bildes. Das bei 488 nm Anregung aufgezeichnete Bild ist im grünen Kanal dargestellt, das mit 568 nm angeregte im roten.

6.2 Entfaltungsbasierte Bildrekonstruktion

6.2.1 Simulation

Um die Leistungsfähigkeit der entfaltungsbasierten Bildrekonstruktion möglichst objektiv bewerten zu können, wurden Simulationen an synthetischen Datensätzen durchgeführt.

Als Fehlermaß wurde der Mittelwert der quadratischen Abweichung von Rekonstruktion und Simulationsobjekt verwendet. Da bei der konventionellen frequenzraumbasierten Rekonstruktion die absoluten Helligkeitswerte auf praktisch nicht reproduzierbare Weise manipuliert werden, mussten die Bilder normiert werden (hier: auf eine Summe von 1). Das Fehlermaß E_i der unterschiedlichen Rekonstruktionen ist gegeben durch

$$E_i = \|\mathbf{b}_i - \mathbf{I}\|^2/n . \quad (6.1)$$

Hierbei wurde zur vereinfachten Darstellung des Zusammenhangs die Vektornotation verwendet. \mathbf{b}_i ist das rekonstruierte Objekt, \mathbf{I} das synthetische Objekt, n die Zahl der Bildpunkte. Es wurde also der Mittelwert der quadratischen Abweichung von rekonstruiertem und perfektem synthetischen Objekt berechnet. Durch die Anzahl der Bildpunkte wurde geteilt – also der Mittelwert gebildet –, damit der Fehlerwert nicht von der Größe des Bildes abhängt. Die Größe der mittleren oder summierten quadratischen Abweichungen der Datenpunkte wird normalerweise als Fehlerenergie (engl. *error energy*) bezeichnet.

Damit der Vergleich fair ist, wurde hierbei keine Regularisierung im Sinne eines glättenden Regularisierungsfunktionals (z.B. *total variation*) angewandt. Eine solche Regularisierung setzt *a priori* Annahmen über das Objekt voraus, deren Berechtigung im Fall von Mikroskopiedaten zweifelhaft ist. Insbesondere bei synthetischen Datensätzen, aber auch bei realen Daten, kann iterative Entfaltung durch die Verwendung eines Regularisierungsterms wie z.B. Total Variation allerdings sehr gute Ergebnisse erreichen.

Dennoch ist bei Entfaltung eine gewisse Regularisierung erforderlich, da es sonst zu einer übermäßigen Verstärkung des Rauschens kommt. Die Regularisierung wurde daher durch einen rechtzeitigen Abbruch des iterativen Entfaltungsvorgangs realisiert.

Verwendet wurde ein reiner Richardson-Lucy-Algorithmus (das im Methodenteil beschriebene ungesteuerte Verfahren). Um hierbei das bestmögliche Ergebnis zu erreichen, wurde der Anhaltspunkt dadurch ermittelt, dass nach jedem Iterationsschritt das Zwischenergebnis mit dem für die Simulation verwendeten Objekt unter Nutzung des vorausgesetzten Fehlermaßes (6.1) verglichen wurde.

Bei der konventionellen Rekonstruktion wurde analog vorgegangen. Hierbei gibt es auch einen Regularisierungsparameter: den Signal-zu-Rausch-Parameter des Wiener Filters (hier Wiener-Parameter genannt). Bei der konventionellen Rekonstruktion wird das Bild

invers mit der PSF gefiltert (entfaltet). Um hierbei das Rauschen als normalverteilt angenommen korrekt zu berücksichtigen, ist theoretisch das Leistungsspektrum (Die Fouriertransformierte der Autokorrelation $\tilde{\rho} \cdot \tilde{\rho}^*$) des Objekts notwendig, welches allerdings unbekannt ist. Daher wird bei der konventionellen SIM-Rekonstruktion hierfür ein konstanter Wert vorausgesetzt. Da das Rauschen ebenfalls nicht frequenzabhängig ist, ist der Quotient aus den Leistungsspektren von Objekt und Rauschen eine Konstante, der Wiener-Parameter. Der Wert dieses Parameters muss vom Anwender vorgegeben werden. Um den bestmöglichen Wiener-Parameter zu verwenden, wurde dieser iterativ unter Verwendung der Matlab-Funktion `fminunc` bestimmt.

Es wurden zwei unterschiedliche Objekte verwendet:

- ein **Testbild** bestehend aus einem Siemensstern in der x - y -Ebene und zwei Bändern, deren z -Position einem Ausschnitt des Kosinus folgt (siehe Abbildung 6.4, linke Seite)
- eine ellipsoid begrenzte **Rauschverteilung** um im Gegensatz zum stark geordneten Testbild eine äußerst ungeordnete Objektverteilung zu repräsentieren (Abbildung 6.4, rechte Seite). Das Rauschen liegt lediglich auf Frequenzen unterhalb der halben Pixelfrequenz (Nyquist-Shannon-Grenze), ist aber unter dieser Grenzfrequenz weiß.

Als Rauschmodell wurde ein rein poissonverteiltes Rauschen angenommen. Es wurde jeweils ein Bild mit wenig Signal und ein Bild mit gutem Signal rekonstruiert. Hierzu wurde der Erwartungswert der Photonenzahl im hellsten Bildpunkt auf 100 beziehungsweise 1000 Photonen festgelegt. Es wurde strukturierte Beleuchtung mit Zweistrahlinterferenz angenommen und als Gitterperiode wurden 300 nm verwendet. Das Beleuchtungsmuster wurde in drei Orientierungen (0° , 60° , 120°) und mit drei Phasenschritten (0π , $2/3\pi$, $4/3\pi$) angewandt, womit den Rekonstruktionen 9 Einzelbilder vorlagen. Allen Rekonstruktionen lagen die selben PSFs und dieselben perfekt vorgegebenen Beleuchtungsparameter zugrunde.

In Tabelle 6.1 sind die Ergebnisse der zwei- und dreidimensionalen Frequenzraumrekonstruktion und der entfaltungsbasierten Rekonstruktion dargestellt. Die Fehlerenergien sind bei der entfaltungsbasierten Rekonstruktion wesentlich geringer.

Abbildung 6.5 zeigt die Ergebnisse der Rekonstruktionen am Testbild. Während sich die Ergebnisse der beiden konventionellen Rekonstruktionen stark ähneln, weist die Entfaltungsrekonstruktion vor allem eine verbesserte z -Separation auf. Die laterale Auflösung lässt sich gut am Siemensstern erkennen. Die konzentrisch zusammenlaufenden Dreiecke rücken in Richtung des Zentrums der Scheibe zusammen und werden dabei schmaler. Sobald sie die Auflösungsgrenze unterschreiten, können sie nicht mehr dargestellt werden

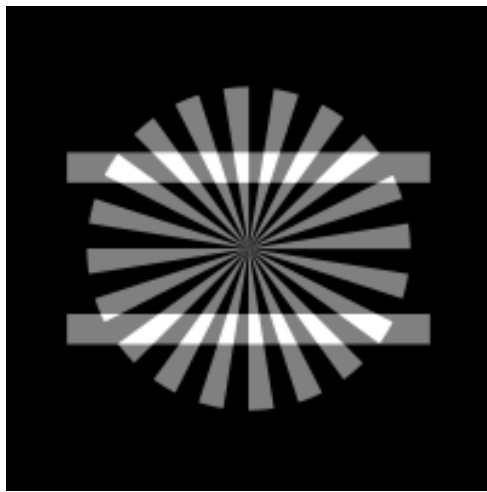
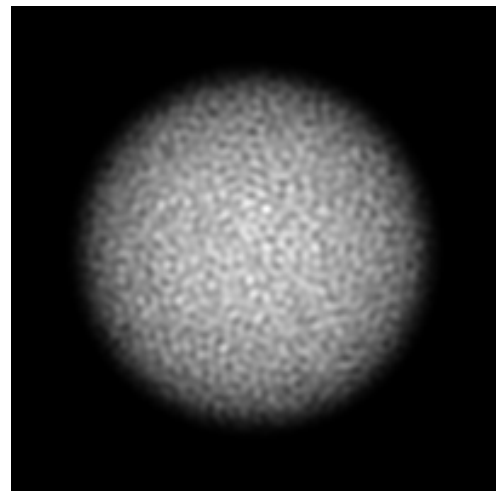
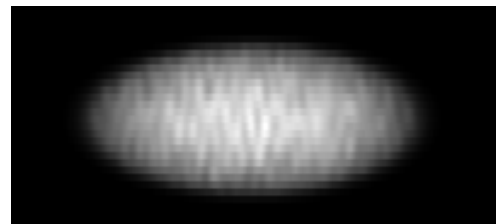
(a) z -Projektion des Testbildes(b) z -Projektion des Rauschobjektes(c) y -Projektion des Testbildes(d) y -Projektion des Rauschobjektes

Abbildung 6.4: Testobjekte zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der verschiedenen Methoden

Objekt	$E_{2D FT}$	$E_{3D FT}$	E_{MLD}
Rauschen 100 Photonen	$1,9 \cdot 10^{-13}$	$38,6 \cdot 10^{-13}$	$58,0 \cdot 10^{-13}$
Rauschen 1000 Photonen	$1,3 \cdot 10^{-13}$	$20,7 \cdot 10^{-13}$	$32,3 \cdot 10^{-13}$
Testbild 100 Photonen	$1,5 \cdot 10^{-11}$	$4,6 \cdot 10^{-11}$	$5,1 \cdot 10^{-11}$
Testbild 1000 Photonen	$9,1 \cdot 10^{-12}$	$40,8 \cdot 10^{-12}$	$42,0 \cdot 10^{-12}$

Tabelle 6.1: Fehlerenergien der verschiedenen Rekonstruktionsmethoden an den gegebenen Datensätzen. „2D FT“ bezeichnet die konventionelle Ebene für Ebene Rekonstruktion, „3D FT“ die dreidimensionale konventionelle Rekonstruktion unter Verwendung einer dreidimensionalen Fouriertransformation. „MLD“ steht für die entfaltungsbasierte Rekonstruktion.

und es wird stattdessen eine einigermaßen homogene Ebene rekonstruiert. Zum Vergleich ist das entfaltete Weitfeldbild oben links ebenfalls dargestellt. Hier wird die im Vergleich zur SIM-basierten Rekonstruktion verringerte Auflösung deutlich.

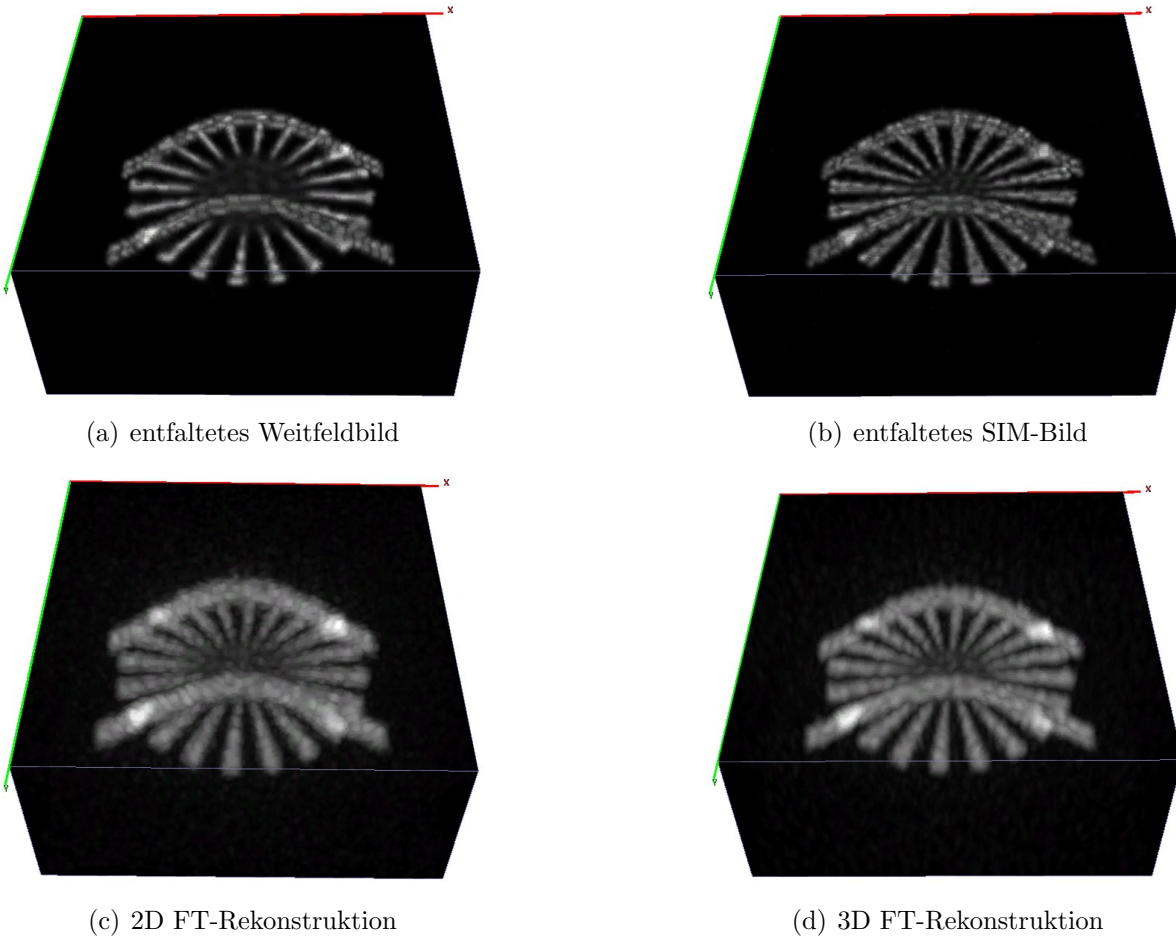
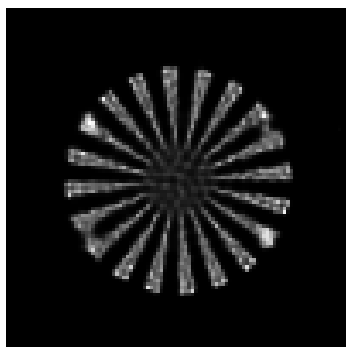


Abbildung 6.5: Ergebnisse der verschiedenen Rekonstruktionsmethoden am Testbild. Eine Entfaltung des nicht strukturiert beleuchteten Weitfeldbildes ist zum Vergleich ebenfalls angezeigt (a).

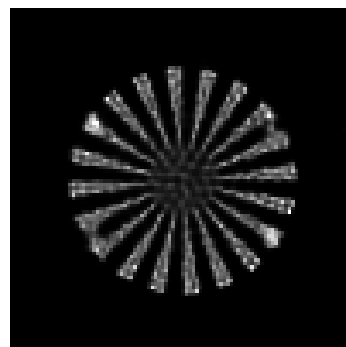
6.2.2 Kreuzvalidierungsbasierter Iterationsabbruch

Bei den im letzten Abschnitt beschriebenen Simulationen wurde die Abbruchbedingung für die Richardson-Lucy-Entfaltung validiert. Bei dieser Methode wird in jedem Iterationsschritt für eine Anzahl an Bildpixeln, welche bei dem Verfahren komplett nicht berücksichtigt werden, die Übereinstimmung mit dem vorwärtssimulierten Bild überprüft. Hierzu wird die neg-log-Likelihoodfunktion für diese Pixel separat berechnet. Wenn die neg-log-Likelihood in Abhängigkeit der Iterationsschritte wieder ansteigt, nimmt der Einfluss des Rauschens auf das Ergebnis überhand und das Verfahren wird abgebrochen. Für die Simulation wurde allerdings nicht abgebrochen, sondern das Bild mit der geringsten neg-log-Likelihood wurde gespeichert und es wurde weiter iteriert bis das Minimum der Fehlerenergie 6.1 überschritten wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.6 dargestellt. Die

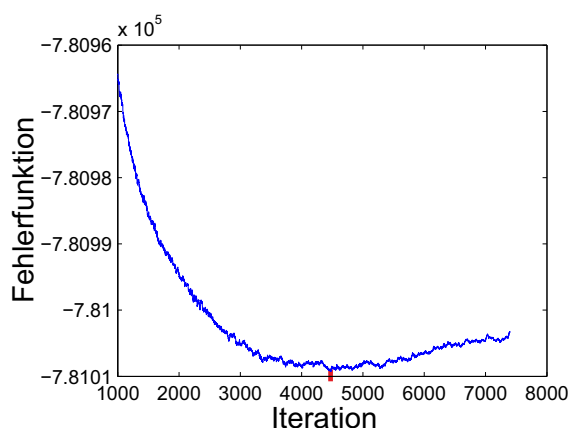
Minima der beiden Funktionen werden in unterschiedlichen Iterationsnummern erreicht. Dies liegt daran, dass zum einen die Fehlerenergie die Objekte vergleicht, während die Likelihoodfunktion auf dem Bild arbeitet, und zum anderen an der Tatsache, dass einmal Gauß'sche und einmal Poisson'sche Statistik angewandt wird. Dennoch ähneln sich die resultierenden rekonstruierten Objekte stark.



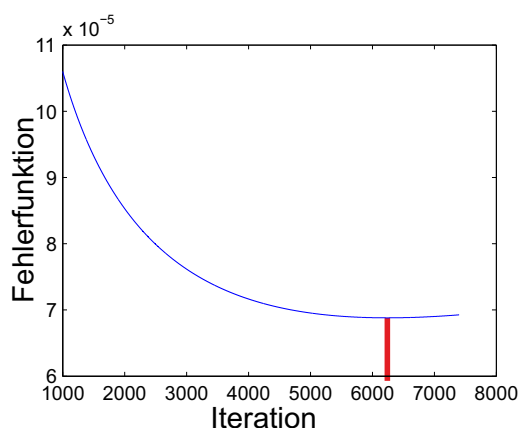
(a) bestes Objekt entsprechend der Kreuzvalidierung



(b) bestes Objekt entsprechend der Fehlerenergie



(c) neg-log-Likelihoodfunktion zur Kreuzvalidierung



(d) Fehlerenergie des entfalteten Objekts

Abbildung 6.6: Das Ergebnis mit der besten Übereinstimmung der Kreuzvalidierung (links) ähnelt dem Ergebnis (b), welches die geringste quadratische Abweichung (Fehlerenergie) vom Originalobjekt aufweist.

Bei der Betrachtung von Abbildung 6.6, fällt außerdem auf, dass die Ergebnisbilder in der x - y -Ebene bereits sichtbares Rauschen aufweisen und dass eine sehr hohe Anzahl an Iterationsschritten angewandt wurde. Dies liegt an der Gestalt des verwendeten Objekts (siehe Abb. 6.4). Dieses ist annähernd zweidimensional und liegt hauptsächlich in einer x - y -Ebene. Da die PSF in der axialen (z)Richtung wesentlich ausgedehnter ist als in den lateralen Richtungen, konvergiert das Bild in dieser Richtung langsamer. Bis das Ergebnis in der z -Richtung einigermaßen konvergiert ist, wird in der lateralen Ebene bereits deutlich das Rauschen verstärkt.

6.2.3 Echte Daten

Die entfaltungsbasierte Rekonstruktion wurde ebenfalls an echten mikroskopischen Daten angewandt. Aufgrund der Begrenztheit des verfügbaren Arbeitsspeichers der für die Entfaltung verwendeten Grafikkarte konnten allerdings nur kleine Objekte rekonstruiert werden.

Da für die Rekonstruktion zur Erzeugung der resultierenden PSF und zum Interpolieren der Bilder die Beleuchtungsparameter genau bekannt sein müssen, wurden hierfür die im Rahmen der konventionellen Rekonstruktion ermittelten Werte verwendet. Die PSF wurde unter Verwendung fluoreszierender Nanopartikel gemessen.

Abbildung 6.7 zeigt eine markierte Zellkernmembran. Dieser Datensatz wurde von Maximilian Hartmann während seiner Bachelorarbeit am Kombimikroskop (Abschnitt 4.3) aufgenommen. Die Probe wurde von Ada L. Olins zur Verfügung gestellt. Offensichtlich ist die Zellkernmembran atypisch eingefaltet, was darauf hinweist, dass die Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung apoptotisch war. Das entfaltete Bild zeigt den Zellkern nach 400 unregulisierten Richardson-Lucy-Iterationen. Offensichtlich ist hier das Rauschniveau deutlich geringer als bei der frequenzraumbasierten Rekonstruktion.

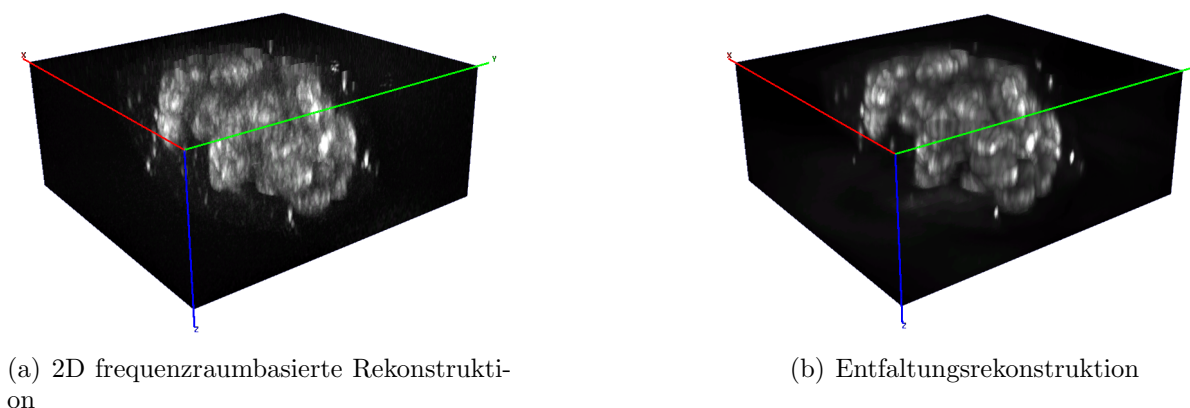


Abbildung 6.7: Vergleich konventioneller Rekonstruktion mit entfaltungsbasierter Rekonstruktion. Markiert ist die Zellkernmembran einer U2O5-Zelle. Die Aufnahme wurde von Maximilian Hartmann während seiner Bachelorarbeit in unserer Gruppe angefertigt. Die Probe wurde von Ada L. Olins zur Verfügung gestellt.

Auch anhand der rekonstruierten Mikroskopiedaten ist eine verbesserte z -Separation der Entfaltungsrekonstruktion erkennbar, wie in Abbildung 6.8 zu sehen ist. In dieser Abbildung ist die Axonmembran retinaler Neuronen zu sehen. Die Aufnahme und die konventionelle Rekonstruktion wurde von Sabrina Roßberger angefertigt. Das Präparat wurde von Dr. Maren Engelhardt⁷ zur Verfügung gestellt. Eine Beschreibung der Präparate ist in der Dissertation von Sabrina Roßberger zu finden [39].

⁷Gruppe Christian Schulz, Institut für Neuroanatomie, CBTM, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg

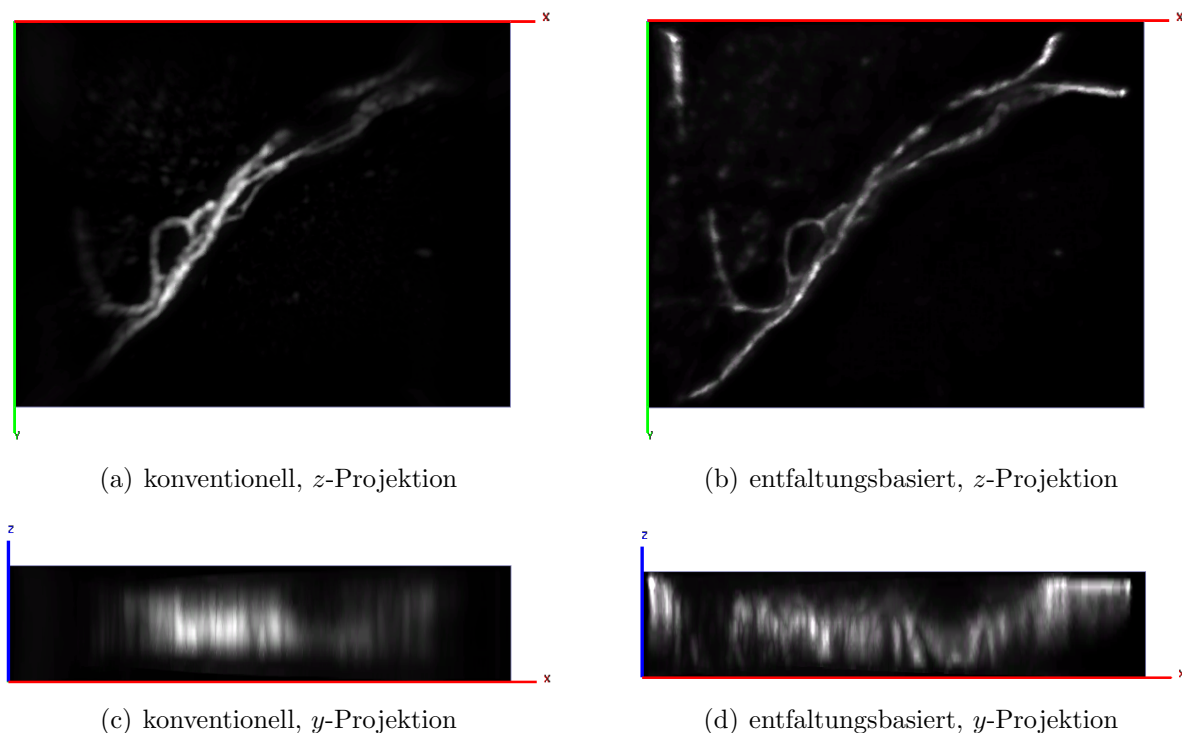


Abbildung 6.8: Die entfaltungsbasierte Rekonstruktion (b,d) liefert im Vergleich zur konventionellen Rekonstruktion (a,c) eine verbesserte z -Separation, wie in der seitlichen Ansicht (Teilbild c bzw. d) zu erkennen ist. Der abgebildete Bereich hat die Maße $18,5\mu\text{m}$ (x), $14,4\mu\text{m}$ (y), $4,0\mu\text{m}$ (z). Dargestellt ist die Membran von Axonen retinaler Neuronen. Die Aufnahme wurde von Sabrina Roßberger angefertigt.

Es fiel bei der Anwendung der Methode an echten Daten auf, dass eine genaue Kenntnis der PSF notwendig ist. In Abbildung 6.9 ist ein rekonstruiertes zweidimensionales Bild zu sehen, welches vor dem Mikroskopumbau des Kombimikroskops aufgezeichnet wurde. Eine gemessene dreidimensionale PSF aus diesem Zeitraum war nicht verfügbar, weswegen eine später gemessene verwendet wurde. Es sind haloartige Ringe in der Umgebung der hellen Strukturen zu erkennen.

Die „gesteuerte“ Entfaltung, welche eine Minimierungsfunktion zur Schrittbestimmung verwendet, konvergiert schneller als die „ungesteuerte“. Allerdings ist hierbei die Regularisierung zwingend erforderlich, da alleine die Schrittweitenoptimierung zu negativen Objektwerten führt. Die Stärke der Regularisierung muss hierbei vom Anwender vorgegeben werden. Durch die Schrittbestimmung durch `minFunc` benötigt diese Methode zusätzlichen Arbeitsspeicher der Grafikkarte, der bei den verwendbaren Geräten nicht zur Verfügung stand. Daher mussten die Daten für `MinFunc` jeweils wieder in den Matlab-Datentyp umgewandelt werden (in den Arbeitsspeicher des PC kopiert werden). Der gesamte *overhead* der komplexeren „gesteuerten“ Entfaltungsmethode führt dazu, dass diese nur in einer unwesentlich kürzeren Zeit konvergiert als die rudimentäre. Zudem ist die Wahl der Regularisierungsparameter durch Ausprobieren sehr umständlich. Daher wurde die ungesteuerte Variante verwendet, deren einzige Regularisierung in der Wahl der

Iterationsschritte durch rechtzeitigen Abbruch des Verfahrens bestand.

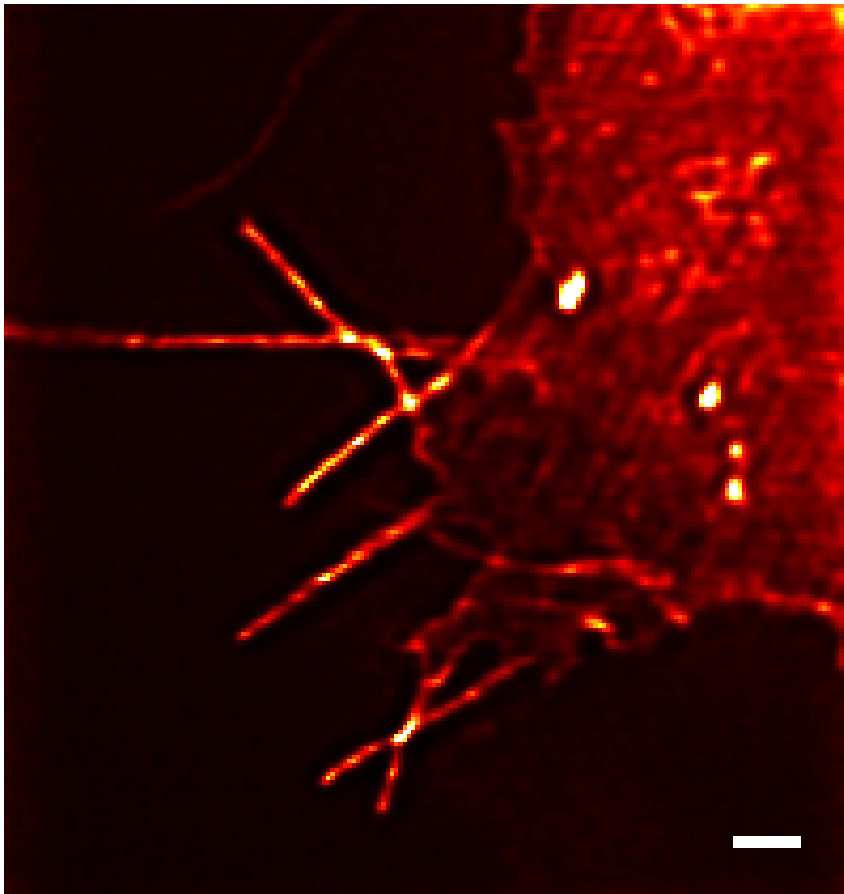


Abbildung 6.9: Entfaltungsrekonstruktion eines zweidimensionalen Datensatzes. Ringartige Artefakte in der Umgebung heller Strukturen sind zu erkennen. Die Erscheinungen lassen sich auf eine fehlerhafte angenommene PSF zurückführen. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von $1 \mu m$

6.3 Erste Ergebnisse der klinischen Prüfung des Ophthalmoskops

Bis jetzt wurden in einem Zeitrahmen von etwa 2 Monaten bereits 9 Probanden bei einer insgesamt für die Studie beantragten Anzahl von 25 Probanden untersucht. Parallel hierzu wurde das Bildauswerteverfahren auf die gewonnenen Daten angepasst.

6.3.1 Datenaufnahme

Im Rahmen der Studie wurden die Probanden über das subjektive Empfinden der Methode befragt. Hierzu wurden sie gebeten, im Vergleich zur herkömmlichen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie zu beurteilen, welche Methode für sie unangenehmer/irritierender war. Da die Befragung durch in der Studie involvierte Personen erfolgte, kann ein aus der Frage ein tendenziöses Ergebnis resultieren. Dennoch kann das Ergebnis einen Anhaltspunkt für das subjektive Empfinden liefern, da anzunehmen ist, dass zumindest ein Teil der Probanden seinen Unmut über die neue Methode geäußert hätte, wenn er sie als stark irritierend oder sogar schmerzhaft empfunden hätte. Acht der Probanden beurteilten die Aufnahme mit dem SI-Ophthalmoskop angenehmer als das Vergleichsprodukt. Ein Proband beurteilte beide Methoden gleich.

Zusätzlich wurde bei den Probanden nach Abklingen der pupillenerweiternden Wirkung der Augentropfen (teilweise an einem späteren Tag) eine Visusmessung (Einschätzung der Sehfähigkeit anhand einer Visustafel) vorgenommen. Im Rahmen der bis jetzt durchgeführten Visusuntersuchungen konnte keine Verschlechterung des Sehens festgestellt werden.

Die Kalibrationsbeleuchtung mit rotem Licht, um den Fokus des Gerätes einzustellen und das Auge der Probanden vor dem Gerät zu positionieren, kann im Wesentlichen als geeignet beurteilt werden. Die Fixierung der Blickrichtung anhand der zusätzlichen beweglichen Fixierungslampe für das nicht untersuchte Auge funktionierte allerdings nicht vollends befriedigend. Häufig änderten die Probanden ihre Blickrichtung, sobald die Aufnahme begann. Auch die Kopfstütze garantierte keine absolute Fixierung des Kopfes, weswegen diese während der Untersuchung bei manchen Probanden zwischen den Aufnahmen nachjustiert werden musste. Bei der Kalibrierung des Gerätes am eigenen Auge und bei Kollegen ohne Verwendung der Laserbeleuchtung (nur die Kalibrierungsbeleuchtung) traten diese Schwierigkeiten nicht auf.

Mit zunehmendem Alter, schlechterem Visus sowie Gesundheitszustand erschwerte sich die Fixierung von Blickrichtung und Kopfposition. Diese Fixierungsschwierigkeiten konnten im Lauf der Studie durch die gewonnenen Erfahrungswerte kompensiert werden. Hierzu wurden den Probanden einfachere Anweisungen im Bezug auf die Blickrichtung gegeben

und die Aufnahmen wurde in einer schnelleren Abfolge durchgeführt, bevor die Konzentrationsfähigkeit der Probanden nachließ.

Im Laufe der Studie konnten durch die gewonnenen Erfahrungswerte diese Fixierungsschwierigkeiten kompensiert werden, indem den Probanden einfachere Anweisungen gegeben wurden und die Aufnahmen in einer schnelleren Abfolge durchgeführt wurden, bevor die Konzentrationsfähigkeit der Probanden nachließ.

Auf die Linse zur Astigmatismuskorrektur wurde verzichtet, da diese die Positionierung des Probanden vor dem Gerät erschwerte. Stattdessen wurden die Probanden gebeten, ihre Brille während der Untersuchung zu tragen, was keine Schwierigkeiten mit sich brachte.

6.3.2 Bildrekonstruktion

An den mit dem Ophthalmoskop aufgenommen Bildern wird zunächst die laterale Verschiebung durch die Mikrosakkaden bestimmt und korrigiert (siehe Methoden 5.3.5).

Die verschiebungskorrigierten Bilder werden zusammen mit den im Rahmen der Verschiebungskorrektur grob bestimmten Parametern des Beleuchtungsmusters (Gittervektor und Phase) der frequenzraumbasierten Rekonstruktionssoftware (PEM) übergeben. Diese bestimmt im Verlauf der Rekonstruktion die Parameter nochmals präzise.

Das Ergebnis einer Rekonstruktion des rechten Auges eines 48-jährigen Probanden ist in Abbildung 6.10 zu sehen. Zur Orientierung wurde das Bild mit der entsprechende Aufnahme des Scanning-Laser-Ophthalmoskops (SLO) überlagert. Der untersuchbare Bereich ist mit dem SI-Ophthalmoskop (SIO) wesentlich kleiner als mit dem konventionellen Gerät. Die Abbildung der fluoreszenzverteilung in dieser Region besitzt mit dem SIO einen stark verbesserten Kontrast und eine erhöhte Auflösung. Da keine bekannte Kalibrierungsstruktur vorliegt, ist die erreichte Auflösung schwierig abzuschätzen. Eine Analyse des Frequenzspektrums ergibt eine Auflösung von $15 \pm 5 \mu m$.

In der konventionellen Aufnahme ist das Makulapigment als dunkle zentrale Region zu erkennen, da dieses das Anregungslicht des Gerätes (Heidelberg Engineering SPECTRALIS[®] HRA) mit einer Wellenlänge von 488 nm stark absorbiert. Bei 532 nm ist das Makulapigment annähernd transparent, weswegen dieser dunkle Fleck im SIM-Bild nicht zu erkennen ist. Während die RPE-Autofluoreszenz in der konventionellen Aufnahme relativ homogen erscheint, ist sie im SIM-Bild vergleichsweise heterogen.

Zum Vergleich der beiden Bilder im Detail sind in Abbildung 6.11 die beiden Ergebnisse vergrößert gegenübergestellt. Im SIO-Bild sind feine dunkle und helle Bereiche zu sehen mit einer Ausdehnung im Bereich zwischen 30 bis $50 \mu m$. Während die kleineren Strukturen in der SLO Aufnahme nicht zu erkennen sind, sind die größeren zumindest noch zu erkennen.

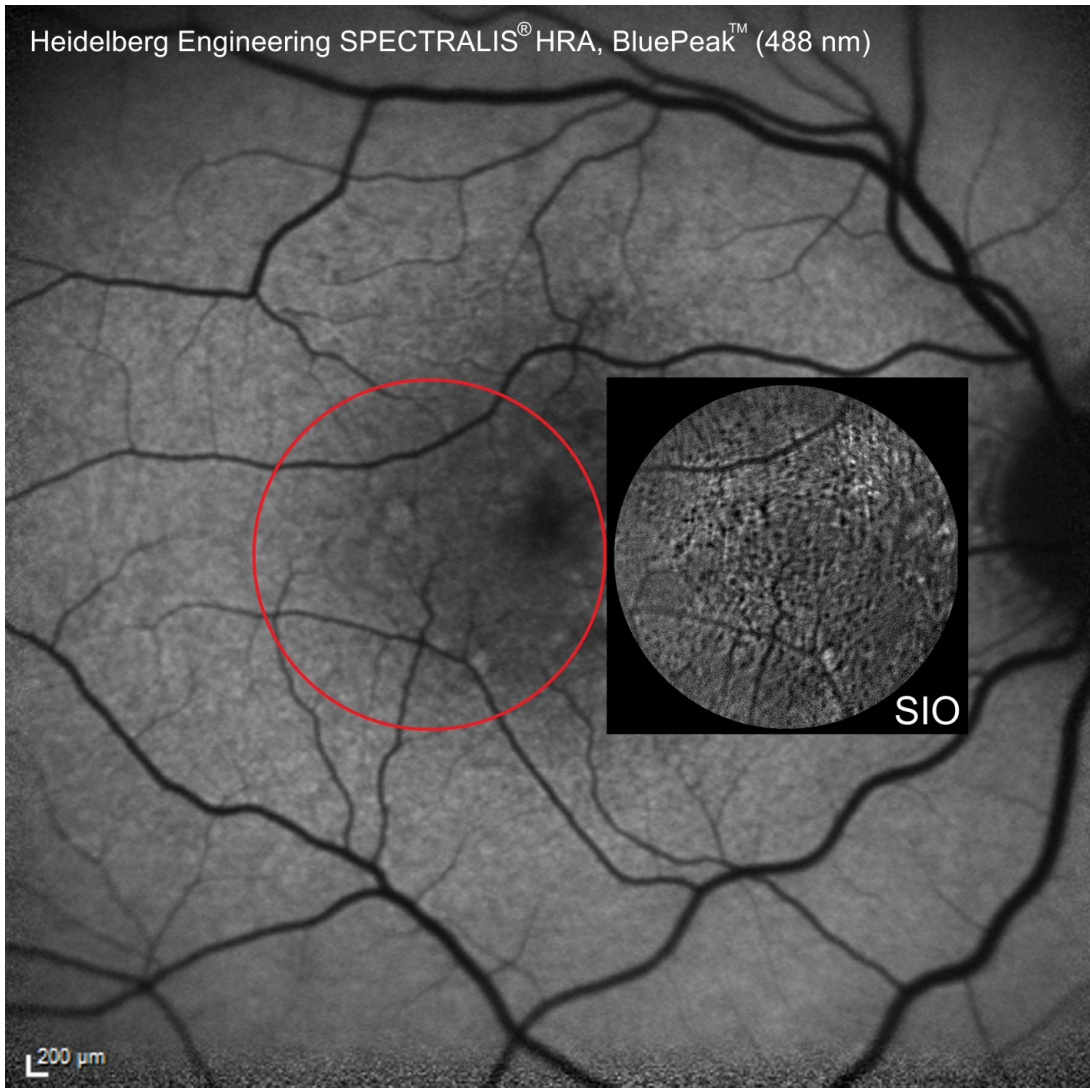


Abbildung 6.10: Der untersuchbare Bereich ist durch den optischen Aufbau beim SIO kleiner als mit dem konventionellen Gerät. Das Signal aus dem RPE liegt in der SIO-Aufnahme mit deutlich höherem Kontrast und besserer Auflösung vor.

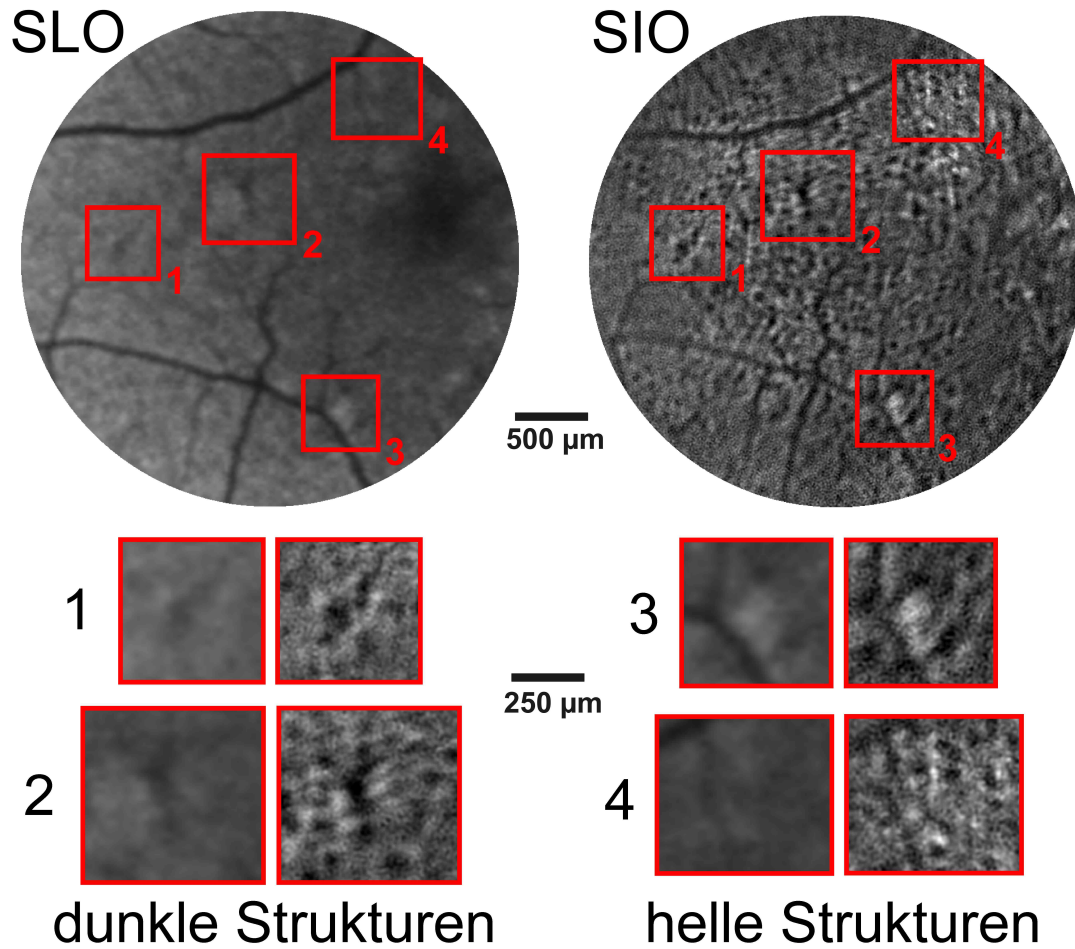


Abbildung 6.11: Vergleich der konventionellen Aufnahme (SLO: Heidelberg Engineering SPECTRALIS® HRA) (links) mit der durch das SI-Ophthalmoskop generierten (rechts). Ausgewählte Bereiche sind vergrößert gegenübergestellt. Sowohl die größeren dunkleren Strukturen, als auch die hellen Regionen sind auch in der SLO-Aufnahme zu erkennen. Mit dem Ophthalmoskop kann jedoch die Substruktur der Fluoreszenzverteilung aufgelöst werden.

7 Diskussion

7.1 Bildzusammenführung

Durch die realisierte Bildzusammenführung ist die Untersuchung großer zusammenhängender Bereiche erstmals mit strukturierter Beleuchtung möglich. Die dabei angewandte Bleichkorrektur führt zu einer gleichmäßigen Gewichtung der Fluoreszenzstärke des Objekts, wodurch auch eine quantitative Untersuchung der Fluoreszenz möglich wird.

7.1.1 Anwendung zur Lipofuszinbildung

Die Fluoreszenz des Lipofuszin entsteht durch ein Zusammenwirken verschiedener Fluorophore (siehe Grundlagen 4.4.2). Da diese Fluorophore in der Regel unterschiedliche Bleichraten besitzen, verhält sich das Bleichen multiexponentiell. Daher ist die Annahme eines einfach exponentiellen Zerfalls für das Bleichen, wie sie der Bildzusammenführung zugrunde liegt, streng genommen nicht korrekt. Da dennoch keine sichtbaren Artefakte in den Helligkeitsübergängen der zusammengefügt Bilder zu erkennen sind, ist die einfachexponentielle Näherung offenbar hinreichend genau. Zudem ist anzunehmen, dass es bei Lipofuszin zu einem *cross-channel*-Bleichen kommt, dass also beispielsweise bei der Aufnahme mit 568 nm die folgende Aufnahme mit 488 nm ebenfalls gebleicht wird. Die Bildzusammenführung betrachtet jedoch beide Kanäle separat. Bei der Aufnahme der Bilder waren beide Laser durch vorherige Justierung sehr gut überlagert. Ebenfalls ist bei den beiden verwendeten Lasern des selben Hersteller die Halbwertsbreite bzw. Standardabweichung des Strahlprofils sehr ähnlich. Dass die Intensitätskorrektur so gut funktionierte, ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen. Es muss also bei der Anwendung der Bildzusammenführung bei Lipofuszinpräparaten in Zukunft darauf geachtet werden, dass sich beide Anregungsstrahlen gut überlagern, um eine gute Kompensation des Bleichens zu gewährleisten. Bei der Nutzung konventioneller Fluorophore gilt diese Einschränkung jedoch nicht. Diese zerfallen exponentiell und besitzen normalerweise nur einen sehr geringen *cross-talk*, können also unabhängig voneinander aufgenommen werden.

7.1.2 Schwankende Melanin- und Lipofuszinindichte

In der zusammengefügt Aufnahme (Abbildung 6.3) fällt auf, dass die Granuladichte innerhalb der Probe ortsabhängig schwankt. Offenbar zieht sich eine mehrere Zellen umfassende Furche diagonal durch das Volumen, welche eine deutlich reduzierte Granuladichte enthält. Die Aufnahmen des Ophthalmoskops mit strukturierter Beleuchtung weisen ebenfalls eine heterogene Fluoreszenzstärke auf. Als Ursache dieser Schwankung, welche auch generell bei der Untersuchung von histologischen RPE-Präparaten auffällt,

wurde zunächst eine Schwankung der Dichte des Melanin angenommen. Melanin, der auch in der Haut vorkommende Farbstoff zur Lichtabsorption mit dem Zweck zum Schutz des Gewebes, liegt in den sogenannten Melanosomen vor. Dies sind etwa $1 \mu\text{m}$ große, ovale Partikel, die sich im RPE an der den Photorezeptoren zugewandten Seite befinden. Durch ihre lichtabsorbierende Eigenschaft erscheinen Zellen bei Fluoreszenzbildgebung dunkler, wenn sie eine verhältnismäßig hohe Zahl an Melanosomen besitzen. Es ist zuvor bereits aufgefallen, dass die Anzahl an Melanosomen innerhalb der Zellen des RPE stark schwankt, ohne dass dieser Sachverhalt näher untersucht und quantifiziert wurde. Die Melanosomen sind bei Weitfeldaufnahmen durch ihre absorbierende Funktion als dunkle Flecken in den nicht rekonstruierten Daten zu erahnen. Ebenfalls weisen sie eine schwache Autofluoreszenz bei Bestrahlung mit rotem Licht auf. Zum Zeitpunkt der Aufnahme der zusammengeführten Bilder war allerdings keine rote Lichtquelle verfügbar.

Mit der strukturierten Beleuchtung lassen sich die einzelnen Lipofuszingranula auflösen, weswegen im zusammengesetzten Bild klar wird, dass die Helligkeitsschwankung hier im wesentlichen auf die schwankende Lipofuszingranuladichte zurückzuführen ist. Allerdings ist innerhalb dieser lipofuszinarmen Furche offenbar zugleich die Melanindichte erhöht. Melanin lässt sich erkennen, wenn es eine Verbindung mit Lipofuszin eingeht und sich daher autofluoreszierendes Material auf der Oberfläche der Melanosomen anlagert. Die resultierenden sogenannten Melano-Lipofuszingranula erscheinen meist kreis- oder sichelförmig. Im Schnitt durch die zusammengesetzte Aufnahme (Abbildung 6.2) sind diese Granula vor allem in der oberen Bildhälfte zu sehen. Offenbar korreliert die Lipofuszingranuladichte in dem aufgenommenen Bild negativ mit der Melanindichte. Auf einer mikroskopischen Skala wurde der Zusammenhang der Konzentrationen von Lipofuszin und Melanin noch nicht beschrieben. Bei der Betrachtung einzelner Individuen ist allerdings ein derartiger Zusammenhang zu erkennen. Menschen mit dunklerer Hautfarbe, welche damit ebenfalls eine erhöhte Melaninkonzentration innerhalb des RPE besitzen, weisen eine kleinere Menge Lipofuszin im RPE auf als gering pigmentierte Personen [45]. Es ist zudem bekannt, dass stark pigmentierte Menschen nur eine geringe Wahrscheinlichkeit aufweisen, an AMD zu erkranken [80].

Durch die Bildzusammenführung ist es möglich, den Zusammenhang von Melanin und Lipofuszin auf einer mikroskopischen und dennoch mehrere Zellen umfassenden Ebene zu untersuchen.

7.2 Entfaltungsbasierte SIM Rekonstruktion mit Pixelsortierung

Die Ergebnisse sowohl der Simulationen 6.2.1, als auch der Entfaltungen von echten Daten 6.2.3 zeigen eine prinzipielle Überlegenheit der entfaltungsbasierten Rekonstruktion gegenüber der konventionellen frequenzraumbasierten Methode.

Während die Möglichkeit der Annahme eines realistischen, nichtlinearen Rauschmodells zu einem Teil für das bessere Abschneiden verantwortlich ist, ist der Hauptgrund für dieses Ergebnis in der ermöglichten Annahme der Nichtnegativität des Objekts zu sehen. Beide Annahmen können aufgrund ihrer Nichtlinearität und ihrer Ortsabhängigkeit nicht mit einem frequenzraumbasierten Entfaltungsfiler (siehe Grundlagen 4.1.7.1) berücksichtigt werden.

7.2.1 Artefaktanfälligkeit

Es wurde allerdings auch beobachtet, dass die entfaltungsbasierte Rekonstruktion im Vergleich zur konventionellen eine erhöhte Anfälligkeit auf unpräzise Vorgaben der *a priori* Parameter aufweist. Wenn beispielsweise die vorgegebene PSF nicht gut mit der angenommenen übereinstimmt, kommt es zu Verfälschungen im rekonstruierten Objekt, was in Abbildung 6.9 zu sehen ist. Ist die Phase der periodischen Beleuchtung nicht präzise vorgegeben, kommt es zu Streifenmustern. Bei unpräzisem Gittervektor kommt es zu niedrigfrequenter Modulation der Helligkeit. Diese Artefakte treten zwar auch bei der frequenzraumbasierten Rekonstruktion auf, sind hier aber weniger deutlich.

Zur Lösung dieser Problematik gibt es drei mögliche Ansätze:

- Erhöhung der Präzision der Parameter durch das Experiment: durch Verwendung eines festen Gitters oder eines SLM sind die Gittervektoren und die Phasen im Gegensatz zu Interferometeraufbau des Kombimikroskops 4.3 sehr genau vorgegeben. Eine Bestimmung der Parameter *a posteriori* anhand der aufgenommenen Bilder ist nicht mehr notwendig.
- Verbesserung der Bestimmung der Parameter in der konventionellen Rekonstruktion (diese Werte werden für die Entfaltung übernommen). Insbesondere die Bestimmung des Gittervektors ist nicht sonderlich präzise und sollte sich verbessern lassen.
- Bestimmung der Parameter (inklusive der PSF) iterativ im Rahmen der Entfaltung. Diese Methode wird *blind deconvolution* genannt.

Während der zweite Punkt – Verbesserung der Parameterbestimmung – im Hinblick auf den ungenau bestimmten Gittervektor kurzfristig optimiert werden kann, stellt die dritte

Option die umfassendste Lösung dar. Auch wenn dies in Kombination mit der Pixel-sortierung prinzipiell machbar ist, wäre es hierzu einfacher, das Beleuchtungsmuster ins Bildgebungsmodell zu integrieren.

Allerdings ist es auch hierbei notwendig, den Anteil des Beleuchtungsmusters, der entlang der z -Achse veränderlich ist, in die PSF zu integrieren und somit aus der Beleuchtung selbst zu entfernen (siehe „mitfahrendes Beleuchtungsmuster“ 4.2.1.3). Dies gilt zumindest für den Fall, dass dreidimensionale Daten rekonstruiert werden sollen und Dreistrahlinterferenz zur Beleuchtung genutzt wird 4.2.4.

Hierbei könnte die PSF ebenfalls im Rahmen der Entfaltung bestimmt werden (*blind deconvolution*). In der Praxis werden hierbei schrittweise abwechselnd Parameter und Objekt optimiert. Ein zusätzlicher Parameter, dessen Bestimmung auch im Rahmen der Entfaltung geschehen kann, ist die Verschiebung des Objekts zwischen einzelnen Bildern. Dies wäre nützlich für die Rekonstruktion von Bildern, welche mit dem Ophthalmoskop aufgenommen wurden.

7.2.2 Rechenaufwand

Während iterative entfaltungsbasierte Algorithmen quasi per Definition das bestmögliche Ergebnis liefern, was von den Ergebnissen (Abschnitt 6.2) bestätigt wird, sind diese rechenmäßig außerordentlich teuer. Bis zur Konvergenz des Ergebnisses sind in der Regel mehrere hundert bis tausend Iterationen notwendig. Der Hauptlast in jedem Iterationsschritt wird durch die Faltung im Rahmen der Vorwärts- und Rückwärtssimulation verursacht. Diese Faltung wird im Frequenzraum durchgeführt (Nutzung des Faltungstheorems und der Reduzierbarkeit der diskreten Fouriertransformation) und die dazu notwendigen diskreten Fouriertransformationen stellen den wesentlichen limitierenden Faktor dar. Für die frequenzraumbasierten Rekonstruktion sind hingegen prinzipiell lediglich zwei Fouriertransformationen erforderlich.

Zur Lösung des Problems auf den Vollzug des Moore'schen Gesetzes (Verdoppelung der Rechenleistung etwa alle ein bis zwei Jahre) zu warten, erscheint nicht praktikabel.

Die Verwendung herkömmlicher paralleler Programmierung im Sinne von Rechnerverbänden ist ebenfalls wenig sinnvoll, da sich die Faltung im Fall mikroskopischer Weitfelddaten über das gesamte Bild erstreckt und die Entfaltung rekursiv arbeitet. Daher ist es schwierig, das Problem zu zerlegen und auf die einzelnen Rechner zu verteilen.

Allerdings ist die Fouriertransformation selbst aufgrund ihrer Linearisierbarkeit gut geeignet für massiv-parallele-Berechnung durch Vektorprozessoren (z.B. Grafikprozessoren; GPU, engl. *graphics processing unit*). Hierdurch kann die Berechnung der Fouriertransformation etwa um einen Faktor 10 bis 100 beschleunigt werden. Bei der Verwendung

von GPUs werden die genutzten Daten im gemeinsamen Arbeitsspeicher der Grafikkarte (GPU-RAM) gespeichert. Die Entfaltung strukturiert beleuchteter Daten weist einen relativ großen Speicherbedarf auf. In der Regel ist eine Erhöhung der Samplingrate erforderlich, um die supraauflösende Information zu übertragen. Ein großes dreidimensionales Bild mit etwa $1000 \cdot 1000 \cdot 100 = 10^8$ Bildpunkten nimmt daher als *single precision float* Datentyp 380 MiB ein. Durch das Speichern der PSF, der Vorwärtssimulation, Masken, etc. werden hierdurch schnell 2 GiB und mehr benötigt. Möchte man weitgehend auf das Hin- und Herkopieren von Daten aus dem RAM in den GPU-RAM verzichten, vervielfältigt sich die Menge durch die Anzahl der verschiedenen Beleuchtungsmuster.

Aus diesem Grund stellte der verfügbare Arbeitsspeicher der Grafikkarte für die Arbeit zur entfaltungsbasierten Rekonstruktion eine Limitierung dar. Ebenfalls gab es gelegentlich Probleme durch Rechenfehler/Speicherfehler der vermutlich überhitzenden Grafikkarte, die nicht für wissenschaftliche Berechnungen konzipiert ist und daher keine Fehlerkorrektur besitzt. Durch die rekursive Natur der Entfaltung kann ein einzelnes fehlerhaftes Voxel während der Entfaltung die gesamte Rekonstruktion zunichtemachen. Wegen der Verwendung von CudaMat (eine Adaption von CUDA für Matlab angelehnt an die DipImage Toolbox) von Rainer Heintzmann war man auf Grafikkarten von NVIDIA angewiesen. Mittlerweile sind für wissenschaftliches Rechnen konzipierte Grafikkarten von NVIDIA verfügbar (Tesla K20X, Tesla K40), die genügend Arbeitsspeicher aufweisen (12 bzw. 6 GiB) und überaus leistungsfähig sind (4.29 Tflops bzw. 3.95 Tflops). Auch der Ableger für den Computerspielebereich (GeForce GTX TITAN) käme in Frage, da *single* Genauigkeit für Entfaltung ausreichend ist. Die Anschaffung einer solchen Karte stellt somit eine kurzfristige Lösung des Problems dar.

Die Zukunft betreffend ist zu beobachten, dass CPUs mehr und mehr als sogenannte APUs (*accelerated processing unit*) konzipiert werden (für Privatanutzer vorgesehene Prozessoren sind mittlerweile fast ausschließlich APUs). Hierbei wird die CPU durch eine GPU ergänzt. Beide Prozessoreinheiten teilen sich den selben Speicher, weswegen man hier nicht auf den begrenzten GPU-RAM angewiesen ist und daher das Verschieben der Daten entfällt. Ein Hindernis stellt lediglich die Fragmentierung der Programmierschnittstellen dar, weswegen die Möglichkeiten der APUs gegenwärtig noch von wenigen Programmen genutzt werden. Es ist zu hoffen, dass in Zukunft auch weniger erfahrenen Programmieren vor allem in der Wissenschaft diese Möglichkeiten zugänglich gemacht werden z.B. durch die direkte Verwendung von APU Funktionalitäten durch Matlab beim Ausführen eines *high level* Befehls wie einer FFT.

Eine weitere (nicht-technische) Beschleunigung der iterativen Entfaltung kann durch Verwendung eines effektiveren Optimierungsalgorithmus geschehen. Während die ungesteuerte Variante keine Schrittbestimmung nutzt und daher langsam konvergiert, nutzt die gesteuerte, regularisierte Variante, welche auf Software von Rainer Heintzmann basiert, ein

Quasi-Newton-Verfahren (LBFGS) zur Bestimmung von Schrittichtung und -weite. Das Verfahren arbeitet optimal bei der Minimierung quadratischer Funktionen. Dies gilt für die neg-log-Likelihoodfunktion näherungsweise. Für die *total variation*-Regularisierung ist dies jedoch nicht der Fall. Andere Verfahren [81, 82] sind zur Minimierung solcher Funktionale besser geeignet und würden schneller konvergieren.

7.2.3 Vergleich mit alternativen entfaltungsbasierten Methoden

Wie bereits im Methodenteil erwähnt, existieren relativ neue Publikationen zu alternativen entfaltungsbasierten Methoden zur Rekonstruktion strukturierter Daten [71, 72]. Diese nutzen den naheliegenden Ansatz, das Beleuchtungsmuster in den Bildgebungsprozess (die Vorwärtssimulation) zu integrieren. Hierbei wird also keine Pixelsortierung/Interpolierung angewandt. Die theoretische Leistungsfähigkeit dieser Methoden und der in dieser Arbeit beschriebenen ist identisch, da alle auf dem *maximum likelihood*-Prinzip mit den selben Annahmen beruhen.

Ein Vorteil der anderen Methoden liegt darin, dass sich durch Einbeziehung des Beleuchtungsmusters in den Bildgebungsprozess dieses weniger aufwändig im Rahmen von *blind deconvolution* optimieren lässt.

Der Vorteil der sortierungsbasierten Methode liegt hingegen darin, dass die Beleuchtung sowohl in x und y , als auch in axialer (z -)Richtung in die PSF integriert ist, wodurch sich das Problem einheitlicher behandeln lässt. Wenn man die Mischung der Daten durch die Interpolierung und damit auch des Rauschens vernachlässigt, können ohne weitere Anpassung beliebige existierende Entfaltungsalgorithmen an den sortierten Daten angewandt werden.

7.3 Ophthalmoskop mit strukturierter Beleuchtung

7.3.1 Bewertung der Ergebnisse

In der Studie konnte gezeigt werden, dass durch die strukturierte Beleuchtung in der Weitfeld-Ophthalmoskopie eine im Vergleich zur konventionellen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie erhöhte Auflösung erreicht werden kann. Insbesondere ist auch der Kontrast durch die strukturierte Beleuchtung wesentlich verbessert. Hierdurch können Schwankungen der Fluoreszenzstärke mit besserem Kontrast und höherer Auflösung dargestellt werden, auch wenn die Aberrationen des Auges eine Auflösung einzelner Zellen verhindern. Die erreichbare laterale Auflösung beträgt hierdurch etwa $15\ \mu\text{m}$ und entspricht damit ungefähr der Ausdehnung einer RPE-Zelle. Damit ist zwar das Signal einzelner Zellen separiert darstellbar, eine Abbildung der Zellgrenzen ist aber nicht möglich. Mit strukturierter Weitfeldbeleuchtung lässt sich im Vergleich zur Laser-Scanning-Ophthalmologie ein einfacherer Aufbau mit weniger beweglichen Teilen realisieren. Dadurch können prinzipiell kostengünstigere Geräte hergestellt werden. Scanning-Laser-Ophthalmoskope (SLO) sind hingegen in der Regel so teuer, dass sie lediglich in der klinischen Umgebung zum Einsatz kommen. Zudem ist die Weitfeldbeleuchtung im Gegensatz zur punktwise rasternden Beleuchtung aufgrund der wesentlich geringeren Lichtintensität inhärent ungefährlicher. Bei einem rasternden SLO kann alleine durch eine Fehlfunktion der Rasterungsvorrichtung, die zu einer längerandauernden Beleuchtung eines Punktes führt, eine Schädigung des Auges verursacht werden.

7.3.2 Medizinische Deutung

Auffällig im rekonstruierten Bild sind starke Schwankungen der Helligkeit auf einer räumlichen Skala von 30 bis $80\ \mu\text{m}$. Dies entspricht einem Abstand von ungefähr zwei bis vier RPE-Zellen. Hierbei handelt es sich nicht um ein Artefakt der Bildrekonstruktion. Diese Schwankung deckt sich auch mit dem Ergebnis der Bildzusammenführung (6.1). Auch hier gibt es hellere und dunklere Regionen. Die mit einem Scanning-Laser-Ophthalmoskop unter Verwendung adaptiver Optik aufgenommenen Bilder [54] (siehe Grundlagen 4.19) weisen ebenfalls für das nahe der Makula aufgenommene Bild (7, 5° Superior) eine starke Helligkeitsschwankung auf dieser Längenskala auf. Publikationen zur Verteilung der Autofluoreszenz im Augenhintergrund beschreiben deutlich größere Skalen und lösen die Schwankungen daher nicht auf [83, 84] oder betrachten lediglich einzelne Zellen [85]. Eine mehrere Zellen einschließende Fluktuation der Autofluoreszenzstärke ist nicht beschrieben.

7.3.3 Verbesserungsmöglichkeiten

7.3.3.1 Fixierung

Die Schwierigkeit bei der Durchführung der Studie lag darin, das Auge des Probanden präzise vor dem Ophthalmoskop zu platzieren. Dies betrifft sowohl die Blickrichtung, als auch die Positionierung des Kopfes durch die Kopfstütze. Der Kopf muss bei der Untersuchung mit einer Genauigkeit von etwa einem Millimeter in der gewünschten Position gehalten werden. Aus ergonomischen Gründen konnte dieser hierbei nicht so fest eingespannt werden, dass keine Bewegung mehr möglich gewesen wäre. Der Proband musste den Kopf ohne Muskelanspannung auf der Kopfstütze ablegen. Daher war dieser Effekt stark vom jeweiligen Probanden abhängig. Die Steuerung der Blickrichtung erfolgte durch eine flexibel verstellbare Fixierungslampe für das zweite Auge. Um diese wie vorgesehen nutzen zu können, musste der Proband mit dem zweiten Auge die Lampe stabil fixieren können.

Die Fixierung von Kopf und Auge könnte theoretisch auch mechanisch erfolgen. Der Kopf könnte durch eine Klemmvorrichtung von allen Seiten eingespannt werden. Ebenfalls ist es theoretisch möglich, den Augapfel durch eine Klammer zu fixieren, was bei Operationen angewandt wird. Ein solch invasives Vorgehen zur mechanischen Fixierung scheidet allerdings aus.

Eine mögliche Lösung zur Kopffixierung bestünde (im Fall eines routinemäßig einsetzbaren kommerziellen Produkts) darin, das Gerät flexibel zu lagern, sodass der untersuchende Arzt in der Lage wäre, dieses in allen drei Raumrichtungen zu verschieben und so der Kopfposition des Probanden zu folgen. Kommerzielle SLO-Geräte besitzen eine solche einstellbare Aufhängung.

Um die möglicherweise schlechte Fixierung der Blickrichtung des Probandenauges zu kompensieren, wäre es notwendig, ein größeres Sichtfeld aufzuzeichnen. Somit würde die relevante Region auch im Fall von größeren Bewegungen des Auges noch im betrachteten Bereich liegen. Hierzu bräuchte man jedoch auch eine höhere Pixelanzahl der Kamera, um das Nyquist-Shannon'sche Samplingtheorem einzuhalten. Aus dem selben Grund müsste ein feineres oder größeres Gitter verwendet werden. Hierzu könnte statt eines SLM ein festes (zweidimensionales) Beugungsgitter verwendet werden. Die notwendigen relativen Verschiebungen des Gitters würden durch die stochastischen Augenbewegungen vollzogen. Bei Nutzung einer größeren Fläche ist es zudem erforderlich, mehr Lichtleistung in das Auge einzustrahlen. Die Verwendung eines festen Phasengitters oder eines wissenschaftlichen SLM ergäbe eine verbesserte Lichtausbeute. Da die Lichtquelle nicht kohärent sein muss, könnte man hierfür auch eine auf LED-Technik beruhende Quelle verwenden. Hierzu sind mittlerweile Geräte verfügbar, die eine kollimierte Lichtleistung von $1,8\text{ W}$ mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 520 nm bieten [86].

7.3.3.2 Adaptive Optik

Die Auflösung am Auge ist nicht durch die Beugung, sondern durch die Brechungsfehler der Linse und Hornhaut begrenzt. Durch die Verwendung adaptiver Optik lassen sich diese Aberrationen so weit korrigieren, dass eine beugungsbegrenzte Bildgebung möglich ist. Es wurde gezeigt, dass man hierdurch in Kombination mit SLO eine Auflösung erreichen kann, die es ermöglicht, einzelne RPE-Zellen zu separieren. Die Anwendung von adaptiver Optik ist allerdings nicht auf rasternde Verfahren beschränkt, sondern lässt sich ohne große Anpassungen auch für die Weitfeldbildgebung nutzen. Es ist zu erwarten, dass die Kombination von adaptiver Optik und strukturierter Beleuchtung eine Auflösung bietet, die die der SLO mit adaptiver Optik übertrifft. Einen guten Anhaltspunkt für die Aberrationsfreie Abbildung des Auges liefert die Bildgebung von RPE-Gewebe durch das Kunstauge mit dem SI-Ophthalmoskop (siehe Abbildung 5.21).

Bei der Verwendung adaptiver Optik müsste allerdings eine Kamera mit hoher Pixelzahl verwendet werden, um die hohe Auflösung des Bildes wiedergeben zu können und gleichzeitig eine große Fläche aufzuzeichnen. Es sind bereits wissenschaftliche (sCMOS) Kameras verfügbar, welche es ermöglichen würden, einen identisch großen Bereich mit der benötigten Auflösung aufzunehmen, wie es mit dem beschriebenen SIO ohne AO bei der verwendeten Kamera möglich ist.

Bei der Anwendung punktweise rasternder SLO in Kombination mit AO ist zu beachten, dass durch die adaptive Optik der Laserstrahl auf einen deutlich kleineren Bereich fokussiert werden kann als dies ohne Brechungskorrektur möglich wäre. Im Rahmen der Gefährdungsbestimmung nach ISO 15004-2:2007 ist zur Berechnung der Intensität im Augenhintergrund eine Mittelwertbildung über eine kreisförmige Fläche mit einem Durchmesser von $18 \mu\text{m}$ durchzuführen, was bei stark fokussierter Beleuchtung eine Unterschätzung des ermittelten Intensitätswertes ergibt. Unter Verwendung adaptiver Optik ist es hingegen möglich, das Licht auf eine deutlich kleinere Fläche zu fokussieren (Halbwertsbreite unter $5 \mu\text{m}$), woraus sich in der Praxis eine vielfach erhöhte tatsächliche Intensität ergibt. Diese Begebenheit ist jedoch ISO 15004-2:2007 offenbar nicht berücksichtigt, was die Frage aufwirft, ob die geltende Norm in ihrer aktuellen Fassung zur Beurteilung der Gefährdung von Ophthalmoskopen mit adaptiver Optik geeignet ist. Demnach ist die Sicherheit von SLO-Systemen mit adaptiver Optik kritisch zu hinterfragen, selbst wenn sie entsprechend der Norm als nicht akut gefährdend eingestuft sind. Im Fall der strukturierten Beleuchtung hingegen ergibt sich durch die Verwendung von adaptiver Optik keine wesentliche Erhöhung der Lichtintensität auf Punkten im Augenhintergrund.

7.4 Fazit

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Bildzusammenführung und der entfaltungsbasierenden Rekonstruktion werden bisherige Schwierigkeiten der Bildgebung mit strukturierter Beleuchtung behoben.

Die Bildzusammenführung erlaubt es erstmals, große zusammenhängende Regionen mit einem Durchmesser von über $100\ \mu\text{m}$ mit der Mikroskopietechnik der strukturierten Beleuchtung mit einer Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze aufzuzeichnen. Durch die Nutzung der Methode bei Gewebe des Augenhintergrundes ist es möglich, die räumliche Verteilung der einzelnen fluoreszierenden Granula im RPE in einem viele Zellen umfassenden Bereich aufzulösen. Hieraus ging die Erkenntnis hervor, dass die Dichte der Lipofuszin- und Melaningranula sehr heterogen über das Gewebe verteilt ist. Es existieren mehrere Zellen umfassende Regionen mit deutlich unterschiedlichen Granuladichten. In dem untersuchten Präparat korrelieren die Dichten von Lipofuszin- und Melaningranula offenbar negativ. Es ergeben sich hiermit neue Ansätze zur Erforschung des Zusammenwirkens von Melanin und Lipofuszin sowie deren Rolle für die Entwicklung der altersbedingten Makuladegeneration.

Die Nutzung des Verfahrens ist jedoch keineswegs auf die Untersuchung des retinalen Pigmentepithels beschränkt. Die Bildzusammenführung ist für die SIM-basierte Untersuchung von großen Objekten, wie Zellverbände und insbesondere Gewebepräparate geeignet. Ein Beispiel hierfür sind neuronale Netzwerke. Bei ihrer Untersuchung ist einerseits die hohe Auflösung erforderlich, um die Axone und Dendriten aufzulösen, während andererseits ein großer zusammenhängender Bereich aufgezeichnet werden muss, um diese den einzelnen Zellen zuordnen zu können. Andere Beispiele sind Epithelgewebe und Mikroorganismen wie zum Beispiel der Erreger der Malaria (*Plasmodium falciparum*), welche mit dieser Methode hochauflösend auf subzellulärer Ebene untersucht werden könnten.

Die erarbeitete entfaltungsbasierte Rekonstruktion hingegen benötigt weniger Lichtsignal in der Bildebene und damit eine geringere anregende Lichtleistung, um rauscharme Bilder zu rekonstruieren, als dies bisher der Fall war. Hierdurch können sowohl schwach fluoreszierende Proben als auch lebende Objekte besser untersucht werden. Auch auf Grundlage von Bildern, welche mit geringem Rauschen vorliegen, liefert die entfaltungsbasierte Rekonstruktion überlegene Ergebnisse, wie durch die simulationsbasierte Evaluierung belegt wird 6.2.1. Der Nachteil der entfaltungsbasierten Rekonstruktion liegt im höheren rechnerischen Aufwand, weshalb sie gegenwärtig nicht für großvolumige und zeitkritische Untersuchungen geeignet ist. Mittelfristig kann sie jedoch durch effizientere Minimierungsverfahren und die Nutzung besserer massiv-parallel rechnender Hardware (*GPU-computing*) auch bei routinemäßigen SIM-Rekonstruktionen genutzt werden, um die bisherigen Methoden zu ersetzen. SIM ist aufgrund der vergleichsweise breiten Anwendbarkeit eines der

verbreitetsten superauflösenden Mikroskopieverfahren. Hierdurch ergibt sich aus einem verbesserten Rekonstruktionsverfahren ein großer Nutzen für die Forschung.

Das SIM-basierte Ophthalmoskop liefert Bilder des Augenhintergrundes, welche in ihrer Auflösung Bildern der konventionellen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (SLO) überlegen sind. Dieses konnte im Rahmen einer klinischen Prüfung validiert werden. Zur Erstellung des Gerätes mussten hierbei spezielle Methoden entwickelt werden, um den Schwierigkeiten der Bildgebung am lebenden Auge zu begegnen. Die daraus resultierende Technik kann in leicht abgewandelter Form auch für andere Zwecke wie zum Beispiel die hochauflösende Untersuchung der Haut *in vivo* oder endoskopische Untersuchungen verwendet werden.

Prinzipiell können durch den weniger komplexen Aufbau des SIO im Vergleich zu konventionellen Techniken geringere Kosten für den klinischen Einsatz realisiert werden. Dadurch wird eine bessere Untersuchbarkeit der altersbedingten Makuladegeneration ermöglicht, sowohl explorativ in der Grundlagenforschung als auch klinisch zur Diagnose und Verlaufskontrolle.

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, welche meine Arbeit möglich gemacht haben:

- Bei Herrn Prof. Christoph Cremer für die Ermöglichung der Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe und das hierbei entgegengebrachte Vertrauen. Ebenfalls bin ich ihm dankbar für meine Betreuung mit vielen lebhaften und anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, für sein Gespür und seinen Weitblick und für die unterhaltsamen Anekdoten aus seinem unerschöpflichen Allgemeinwissensschatz.
- Prof. Rainer Heintzmann für die Zurverfügungstellung seiner ausgeklügelten Software und für seine Unterstützung bei der Arbeit zur Bildrekonstruktion. Außerdem danke ich ihm für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe während meiner beiden Kurzaufenthalte in Jena, viele wissenschaftliche Anregungen und Antworten.
- Herrn Prof. Stefan Dithmar für die erfolgreiche Zusammenarbeit, die Unterstützung meiner Arbeit und den Wissensaustausch zwischen Medizin und Physik. Ich würdige auch sein Vertrauen in das Gelingen des Ophthalmoskop-Projektes und seine uneingeschränkte und tatkräftige Unterstützung hierbei.
- Dr. Thomas Ach für die Forcierung der medizinisch-physikalischen Kooperation, seinen großen Einsatz hierfür und seinen medizinischen Rat.
- Den nicht betreuenden Mitgliedern unserer kleinen Gruppe in Heidelberg, namentlich Margund Bach, Martin Hagmann, Sabrina Roßberger, Florian Schock und Nil Celik für die erfolgreiche und angenehme Zusammenarbeit und die gute Arbeitsteilung. Insbesondere bin ich auch für die wissenschaftliche Diskussion dankbar.
- Den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Mainz, insbesondere Dr. Udo Birk.
- Den ehemaligen Wissenschaftlern der Arbeitsgruppe, auf deren Arbeiten die meine gründet. Hervorzuheben sind hierbei Dr. Roman Amberger, Dr. David Baddeley und Dr. Paul Lemmer.
- Ramon Lopez-Perez für die freundschaftliche Zusammenarbeit, sein bio-molekulares Wissen und seine sorgfältige wissenschaftliche Arbeitsweise.
- Herrn Prof. Jürgen Hesser für seine lehrreiche Vorlesung zur Lösung inverser Probleme, welche mir zur Ausarbeitung der entfaltungsbasierten Bildrekonstruktion eine große Hilfe war.
- Meiner Familie für das grenzenlose Vertrauen, die unermessliche Unterstützung während der langen Jahre des Lernens und das Interesse an meiner Arbeit.

Literatur

- [1] Min Gu. *Advanced optical imaging theory*. Springer, 2000.
- [2] Gerrit Best. Weiterentwicklung eines Aufbaus zur multispektralen hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2009.
- [3] M.R. Arnison and C.J.R. Sheppard. A 3D vectorial optical transfer function suitable for arbitrary pupil functions. *Optics communications*, 211(1):53–63, 2002.
- [4] B. Richards and E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems. ii. structure of the image field in an aplanatic system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 253(1274):358–379, 1959.
- [5] James Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer, 2010.
- [6] Y. Hiraoka, J.W. Sedat, and D.A. Agard. The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures. *Science*, 238(4823):36–41, 1987.
- [7] Charles P. Vick. KH-11 KENNAN. Reconnaissance imaging spacecraft. <http://www.globalsecurity.org/space/systems/kh-11.htm>, 2007.
- [8] T. Wilson and A.R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Optics letters*, 12(4):227–229, 1987.
- [9] Marvin Minsky. Microscopy apparatus, December 19 1961. US Patent 3,013,467.
- [10] C. Cremer and T. Cremer. Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. *Microscopica acta*, pages 31–44, 1974.
- [11] D.W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz. Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Applied physics letters*, 44(7):651–653, 1984.
- [12] D. Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2(11):764–774, 2001.
- [13] T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S.W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15):8206–8210, 2000.
- [14] T.J. Gould, P.A. Pellet, and J. Bewersdorf. Sted microscopy. In Ulrich Kubitscheck, editor, *Fluorescence Microscopy*. Wiley-Blackwell, 2013.

- [15] W. Denk, J.H. Strickler, and W.W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, 1990.
- [16] C. Cremer, M. Hausmann, J. Bradl, and B. Rinke. Verfahren zur multispektralen Präzisionsdistanzmessung in biologischen Mikroobjekten. *Deutsches Patentamt*, pages 824–1, 1996.
- [17] A. Esa, P. Edelmann, G. Kreth, L. Trakhtenbrot, N. Amariglio, G. Rechavi, M. Hausmann, and C. Cremer. Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. *Journal of microscopy*, 199(2):96–105, 2000.
- [18] E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H.F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [19] S.T. Hess, T.P.K. Girirajan, and M.D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical journal*, 91(11):4258–4272, 2006.
- [20] M. Bates, B. Huang, G.T. Dempsey, and X. Zhuang. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317(5845):1749, 2007.
- [21] P. Lemmer, M. Gunkel, D. Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, Y. Weiland, J. Reymann, P. Müller, M. Hausmann, and C. Cremer. SPDM: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 93(1):1–12, 2008.
- [22] J. Reymann, D. Baddeley, M. Gunkel, P. Lemmer, W. Stadter, T. Jegou, K. Rippe, C. Cremer, and U. Birk. High-precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via spatially modulated illumination (SMI) microscopy. *Chromosome Research*, 16(3):367–382, 2008.
- [23] David Baddeley. *Precision measurements with SMI and 4Pi Microscopy*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2007.
- [24] G. Best, R. Amberger, and C. Cremer. Super-resolution microscopy: Interference and pattern techniques. In Ulrich Kubitscheck, editor, *Fluorescence Microscopy*. Wiley-Blackwell, 2013.
- [25] R. Heintzmann and C. Cremer. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. In *BiOS Europe '98*, pages 185–196. International Society for Optics and Photonics, 1999.

- [26] M.G.L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198(2):82–87, 2000.
- [27] Nikon. Properties of Microscope Objectives. <http://www.microscopyu.com/articles/optics/objectiveproperties.html>.
- [28] P. Sarder and A. Nehorai. Deconvolution methods for 3-d fluorescence microscopy images. *Signal Processing Magazine, IEEE*, 23(3):32–45, 2006.
- [29] P.J. Verveer, M.J. Gemkow, and T.M. Jovin. A comparison of image restoration approaches applied to three-dimensional confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 193(1):50–61, 1999.
- [30] K. Wicker, O. Mandula, G. Best, R. Fiolka, and R. Heintzmann. Phase optimisation for structured illumination microscopy. *Optics express*, 21(2):2032–2049, 2013.
- [31] Kai Wicker. *Increasing resolution and light efficiency in fluorescence microscopy*. Phd thesis, King’s College London, 2010.
- [32] T. Ach, G. Best, M. Ruppenstein, R. Amberger, C. Cremer, and S. Dithmar. High-resolution fluorescence microscopy of retinal pigment epithelium using structured illumination. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 107(11):1037–1042, 2010.
- [33] T. Ach, G. Best, S. Roßberger, R. Heintzmann, C. Cremer, and S. Dithmar. Autofluorescence imaging of human rpe cell granules using structured illumination microscopy. *British Journal of Ophthalmology*, 96(8):1141–1144, 2012.
- [34] S. Rossberger, T. Ach, G. Best, C. Cremer, R. Heintzmann, and S. Dithmar. High-resolution imaging of autofluorescent particles within drusen using structured illumination microscopy. *British Journal of Ophthalmology*, 97(4):518–523, 2013.
- [35] G. Best, R. Amberger, D. Baddeley, T. Ach, S. Dithmar, R. Heintzmann, and C. Cremer. Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue. *Micron*, 42(4):330–335, 2011.
- [36] Frederik Görlitz. Kombination von TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) und Lokalisationsmikroskopie. Praktikumsbericht, Universität Heidelberg, 2010.
- [37] Frederik Görlitz. Improvement of a setup for 5 colours SW-TIRF-Microscopy. Bachelorarbeit, Universität Heidelberg, 2011.
- [38] S. Rossberger, G. Best, D. Baddeley, R. Heintzmann, U. Birk, S. Dithmar, and C. Cremer. Combination of structured illumination and single molecule localization microscopy in one setup. *Journal of Optics*, 15(9):094003, 2013.

- [39] Sabrina Rossberger. *Combination of Structured Illumination and Localization Microscopy in one Setup applied on Retinal Structures*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2014.
- [40] O. Strauss. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, 85(3):845–881, 2005.
- [41] U.T. Brunk and A. Terman. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5):611–619, 2002.
- [42] D. Mann, P.O. Yates, and B. Marcyniuk. Changes in nerve cells of the nucleus basalis of meynert in alzheimer’s disease and their relationship to ageing and to the accumulation of lipofuscin pigment. *Mechanisms of ageing and development*, 25(1):189–204, 1984.
- [43] G.E. Meredith, S. Totterdell, E. Petroske, K. Santa Cruz, R.C. Callison Jr, and Y.S. Lau. Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of parkinsons disease. *Brain research*, 956(1):156–165, 2002.
- [44] C.K. Dorey, G. Wu, D. Ebenstein, A. Garsd, and J.J. Weiter. Cell loss in the aging retina. relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 30(8):1691–1699, 1989.
- [45] C.J. Kennedy, P.E. Rakoczy, and I.J. Constable. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye*, 9(6):763–771, 1995.
- [46] M.E. Pennesi, M. Neuringer, and R.J. Courtney. Animal models of age related macular degeneration. *Molecular aspects of medicine*, 33(4):487–509, 2012.
- [47] S. Julien and U. Schraermeyer. Lipofuscin can be eliminated from the retinal pigment epithelium of monkeys. *Neurobiology of Aging*, 33(10):2390–2397, 2012.
- [48] N.M. Haralampus-Grynaviski, L.E. Lamb, C.M.R. Clancy, C. Skumatz, J.M. Burke, T. Sarna, and J.D. Simon. Spectroscopic and morphological studies of human retinal lipofuscin granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6):3179–3184, 2003.
- [49] F.C. Delori, C.K. Dorey, G. Staurenghi, O. Arend, D.G. Goger, and J.J. Weiter. In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(3):718–729, 1995.
- [50] F.C. Delori. Spectrophotometer for noninvasive measurement of intrinsic fluorescence and reflectance of the ocular fundus. *Applied Optics*, 33(31):7439–7452, 1994.

- [51] R.D. Jager, W.F. Mieler, and J.W. Miller. Age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, 358(24):2606–2617, 2008.
- [52] R.P. Finger, B. Bertram, C. Wolfram, and F.G. Holz. Blindness and visual impairment in germany: a slight fall in prevalence. *Deutsches Ärzteblatt International*, 109(27-28):484, 2012.
- [53] Heidelberg Engineering. <http://www.heidelbergengineering.com/germany/>.
- [54] J.J. Hunter, B. Masella, A. Dubra, R. Sharma, L. Yin, W.H. Merigan, G. Palczewska, K. Palczewski, and D.R. Williams. Images of photoreceptors in living primate eyes using adaptive optics two-photon ophthalmoscopy. *Biomedical optics express*, 2(1):139–148, 2011.
- [55] J.M. Enoch. Optical properties of the retinal receptors. *JOSA*, 53(1):71–85, 1963.
- [56] J.M. Enoch. Vertebrate receptor optics and orientation. *Documenta Ophthalmologica*, 48(2):373–388, 1980.
- [57] T.T.J.M. Berendschot and D. van Norren. Objective determination of the macular pigment optical density using fundus reflectance spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 430(2):149–155, 2004.
- [58] E.A. Boettner and J.R. Wolter. Transmission of the ocular media. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1(6):776–783, 1962.
- [59] M.J. Costello, S. Johnsen, K.O. Gilliland, C.D. Freel, and W.C. Fowler. Predicted light scattering from particles observed in human age-related nuclear cataracts using mie scattering theory. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(1):303–312, 2007.
- [60] Scott Prahl. Mie Scattering Calculator. http://omlc.ogi.edu/calc/mie_calc.html.
- [61] S. Lerman and R. Borkman. Spectroscopic evaluation and classification of the normal, aging, and cataractous lens (with 1 color plate). *Ophthalmic Research*, 8(5):335–353, 1976.
- [62] C.M. Rao. Synchronous scan fluorescence spectroscopy of proteins and human eye lenses. *Biochemical and biophysical research communications*, 176(3):1351–1357, 1991.
- [63] B. Vohnsen. Photoreceptor waveguides and effective retinal image quality. *JOSA A*, 24(3):597–607, 2007.

- [64] S. Marcos and S.A. Burns. Cone spacing and waveguide properties from cone directionality measurements. *JOSA A*, 16(5):995–1004, 1999.
- [65] Patrick Y. Maeda. Zernike Polynomials and Their Use in Describing the Wavefront Aberrations of the Human Eye. <http://scien.stanford.edu/pages/labsite/2003/psych221/projects/03/pmaeda/index.html>.
- [66] D.R. Williams. Imaging single cells in the living retina. *Vision research*, 51(13):1379–1396, 2011.
- [67] Fiji Image Stitching plugin. http://fiji.sc/Image_Stitching.
- [68] S. Preibisch, S. Saalfeld, and P. Tomancak. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*, 25(11):1463–1465, 2009.
- [69] XuvTools - the “eXtend yoUr View“ Toolkit. <http://www.xuvtools.org/>.
- [70] M. Emmenlauer, O. Ronneberger, A. Ponti, P. Schwarb, A. Griffa, A. Filippi, R. Nitschke, W. Driever, and H. Burkhardt. XuvTools: free, fast and reliable stitching of large 3D datasets. *Journal of Microscopy*, 233(1):42–60, 2009.
- [71] E. Mudry, K. Belkebir, J. Girard, J. Savatier, E. Le Moal, C. Nicoletti, M. Allain, and A. Sentenac. Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns. *Nature Photonics*, 6(5):312–315, 2012.
- [72] R. Ayuk, H. Giovannini, A. Jost, E. Mudry, J. Girard, T. Mangeat, N. Sandeau, R. Heintzmann, K. Wicker, K. Belkebir, et al. Structured illumination fluorescence microscopy with distorted excitations using a filtered blind-sim algorithm. *Optics Letters*, 38(22):4723–4726, 2013.
- [73] Paul Lemmer. *Lichtmikroskopische Untersuchungen konventionell markierter Präparate weit unterhalb der Beugungsgrenze*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2009.
- [74] R. Heintzmann and C. Cremer. Axial tomographic confocal fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 206(1):7–23, 2002.
- [75] Marc Schmidt. minFunc. <http://www.di.ens.fr/~mschmidt/Software/minFunc.html>.
- [76] R.H. Byrd, P. Lu, J. Nocedal, and C. Zhu. A limited memory algorithm for bound constrained optimization. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 16(5):1190–1208, 1995.

- [77] M. Lombardo, S. Serrao, P. Ducoli, and G. Lombardo. Variations in image optical quality of the eye and the sampling limit of resolution of the cone mosaic with axial length in young adults. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 38(7):1147–1155, 2012.
- [78] Life Technologies. Fluorescence SpectraViewer. <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.
- [79] Studienprüfplan: Validierung von Funduskopie mit Strukturierter Beleuchtung an einem prototypischen Ophthalmoskop, 2013.
- [80] Eye Diseases Prevalence Research Group et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the united states. *Archives of ophthalmology*, 122(4):564, 2004.
- [81] J.M. Bioucas-Dias and M.A.T. Figueiredo. A new TwIST: two-step iterative shrinkage/thresholding algorithms for image restoration. *Image Processing, IEEE Transactions on*, 16(12):2992–3004, 2007.
- [82] A. Beck and M. Teboulle. A fast iterative shrinkage-thresholding algorithm for linear inverse problems. *SIAM Journal on Imaging Sciences*, 2(1):183–202, 2009.
- [83] F.C. Delori, D.G. Goger, and C.K. Dorey. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in rpe of normal subjects. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(8):1855–1866, 2001.
- [84] G.L. Wing, G.C. Blanchard, and J.J. Weiter. The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 17(7):601–607, 1978.
- [85] L. Feeney-Burns, E.S. Hilderbrand, and S. Eldridge. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 25(2):195–200, 1984.
- [86] UHP-T-LED-520 - Ultra High Power Green LED Light Source. <http://www.prizmatix.com/UHP/uhp-t-led-520.htm>.

A Anhang

A.1 Abkürzungen und Fremdwörter

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
PSF	Punktbildfunktion
OTF	optische Transferfunktion
NA	numerische Apertur
ROI	<i>region of interest</i> ; Bildausschnitt
SIM	Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung
CLSM	konfokales Laser-Rastermikroskop
SIO	Ophthalmoskopie mit strukturierter Beleuchtung
SLO	Laser-Rasterophthalmoskopie; konventionelle Ophthalmoskopiertechnik
UV	kurzwelliges, ultraviolettes Lichtspektrum
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
RPE	retinales Pigmentepithel
VEGF	Signalmolekül zur Angiogenese
PFA	Paraformaldehyd. Chemikalie zur Fixierung von Präparaten
PEM	PEM-Software. Programm zur konventionellen SIM Rekonstruktion
IBFGS	<i>limited-memory</i> Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno Algorithmus. Numerisches Optimierungsverfahren
FFT	schnelle diskrete Fouriertransformation
TTL	Transistor-Transistor-Logik
CCD	<i>charge-coupled-device</i> -Sensor (Kameratechnik)
LCD	<i>liquid crystal display</i> ; Flüssigkristallbildschirm
SLM	<i>spatial light modulator</i> ; Ortsabhängig einstellbarer flächiger Lichtmodulator
LED	Leuchtdiode
DVI	digital/analoger Anschluss für Computerbildschirme
RS-232	serielle Schnittstelle zur Ansteuerung von Geräten
USB	serieller Schnittstelle zur Ansteuerung von Geräten
PCI	Schnittstelle auf der Hauptplatine des Computers
GPU	Grafikprozessor
CPU	Hauptprozessor
RAM	Arbeitsspeicher
MiB	2 ²⁰ Bytes
GiB	2 ³⁰ Bytes
nm	Nanometer

nm	Nanometer
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
<i>a priori</i>	Im Voraus bekannt
<i>a posteriori</i>	Im Nachhinein erhalten
<i>ad hoc</i>	meint hier: in einem Schritt ohne eventuelle Anpassungen ausgeführte Berechnung im Gegensatz zu iterativen Verfahren

A.2 Mehrfach genutzte mathematische Symbole

\mathbf{r}	Ortsvektor
\mathbf{k}	Wellenvektor
*	Faltungsoperator
$\langle \times \rangle$	Erwartungswert
$\rho(\mathbf{r})$	Objektverteilung
$h(\mathbf{r})$	Punktbildfunktion
$o(\mathbf{k})$	optische Transferfunktion
$I(\mathbf{r})$	Intensität/Erwartungswert des Signals im Bildraum
$Illu(\mathbf{r})$	Beleuchtungsintensität im Objektraum
$\delta(\mathbf{r})$	Dirac'sche Delta-Distribution
\mathcal{F}	Fouriertransformation
\mathcal{F}^{-1}	inverse Fouriertransformation
$\tilde{\times}$	fouriertransformierte
\times'	punktgespiegelte Funktion
\times^*	komplex konjugierte Funktion
p	Wahrscheinlichkeitsfunktion der Messwerte auf einem Pixel
P	kombinierte Wahrscheinlichkeitsfunktion aller Pixelwerte des Bildes
L	Likelihoodfunktion des Objekts
l	negative, logarithmierte Likelihoodfunktion
\mathbf{b}	gemessenes Bild in Vektorschreibweise. Jeder Pixelwert ist durch ein Element von \mathbf{b} bestimmt
\mathbf{I}	Erwartungswert für das Bild in Vektorschreibweise
H	Faltungsmatrix
\times^{-1}	inverse Matrix bzw. Umkehrfunktion

A.3 Bildgebung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)

Im Folgenden wird die Bildentstehung in der Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie mathematisch hergeleitet.

In der Konfokalmikroskopie wird die Probe punktwise mit einem beugungsbegrenzten Beleuchtungsfleck abgerastert, weswegen immer nur die Fluorophore sichtbar sind, welche gerade innerhalb dieses Flecks liegen.

Das Gegenstandsraum ist das leuchtende Objekt durch die Multiplikation von Fluorophorverteilung ρ und dem Beleuchtungsfleck h_{ex} gegeben.

$$Obj(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) \cdot h_{ex}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ex}) \quad (\text{A.1})$$

Im Bildraum ergibt sich durch die Faltung des emittierten Fluoreszenzlichts mit der PSF h_{em} folgende Intensitätsverteilung des Fluoreszenzlichts:

$$I(\mathbf{r}, \mathbf{r}_{ex}) = [\rho(\mathbf{r}) \cdot h_{ex}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ex})] * h_{em}(\mathbf{r}) \quad (\text{A.2})$$

Beim Konfokalmikroskop wird außerdem lediglich das Licht detektiert, welches zunächst die Detektionsblende (engl. *pinhole*) passiert hat. Die gemessene Leistung auf dem Photodetektor $U(\mathbf{r}_{ex})$ ergibt sich also durch Integration der Intensität über die Fläche der Blende. Das Pinhole (Funktion PH) befindet sich immer auf der konjugierten (meint hier: in den Gegenstandsraum projiziert) Position zum Beleuchtungsfokus. Beleuchtung und Detektion sind hiermit konfokal. Die Pinholefunktion ist in z -Richtung die Delta-distribution. In der x - y -Ebene ist sie für gewöhnlich eine radiale Rechteckfunktion. Der Durchmesser des Pinholes kann in der Regel variiert und somit der Aufgabe angepasst werden.

$$U(\mathbf{r}_{ex}) = \int I(\mathbf{r}, \mathbf{r}_{ex}) \cdot PH(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ex}) \, d\mathbf{r} \quad (\text{A.3})$$

$$U(\mathbf{r}_{ex}) = \int [(\rho(\mathbf{r}) \cdot h_{ex}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ex})) * h_{em}(\mathbf{r})] \cdot PH(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ex}) \, d\mathbf{r} \quad (\text{A.4})$$

Die Faltung lässt sich in ihrer Integralform darstellen

$$U(\mathbf{r}_{ex}) = \int \left[\int \rho(\mathbf{r}_h) \cdot h_{ex}(\mathbf{r}_h - \mathbf{r}_{ex}) \cdot h_{em}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_h) \cdot PH(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ex}) \, d\mathbf{r}_h \right] d\mathbf{r} \quad (\text{A.5})$$

$$U(\mathbf{r}_{ex}) = \int \rho(\mathbf{r}_h) \cdot h_{ex}(\mathbf{r}_h - \mathbf{r}_{ex}) \cdot \left(\int h_{em}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_h) \cdot PH(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ex}) \, d\mathbf{r} \right) d\mathbf{r}_h \quad (\text{A.6})$$

Mit Hilfe der Substitution von $\mathbf{r} - \mathbf{r}_h$ durch \mathbf{u} wird ersichtlich, dass der innere Integrand über $d\mathbf{r}$

$$\int h_{em}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_h) \cdot PH(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ex}) d\mathbf{r} = \int h_{em}(\mathbf{u}) \cdot PH(\mathbf{u} + \mathbf{r}_h - \mathbf{r}_{ex}) d\mathbf{u} \quad (\text{A.7})$$

$$= \int h_{em}(\mathbf{u}) \cdot PH(\mathbf{r}_{ex} - \mathbf{r}_h - \mathbf{u}) d\mathbf{u} \quad (\text{A.8})$$

$$= [h_{em} * PH](\mathbf{r}_{ex} - \mathbf{r}_h) \quad (\text{A.9})$$

$$= h_{det}(\mathbf{r}_{ex} - \mathbf{r}_h) \quad (\text{A.10})$$

eine Faltung der Emissions-PSF mit dem Detektions-Pinhole ist. Die resultierende Funktion wird Detektions-PSF h_{det} genannt. Im Schritt von (A.7) zu (A.8) wurde die Punktsymmetrie von PH ausgenutzt.

Durch Einsetzen von (A.10) in (A.6) erhält man

$$U(\mathbf{r}_{ex}) = \int \rho(\mathbf{r}_h) \cdot h_{ex}(\mathbf{r}_h - \mathbf{r}_{ex}) \cdot h_{det}(\mathbf{r}_{ex} - \mathbf{r}_h) d\mathbf{r}_h \quad (\text{A.11})$$

$$= \int \rho(\mathbf{r}_h) \cdot h'_{ex}(\mathbf{r}_{ex} - \mathbf{r}_h) \cdot h_{det}(\mathbf{r}_{ex} - \mathbf{r}_h) d\mathbf{r}_h \quad (\text{A.12})$$

$$= [\rho * (h'_{ex} \cdot h_{det})](\mathbf{r}_{ex}) \quad (\text{A.13})$$

$$U(\mathbf{r}_{ex}) = [\rho * h_{res}](\mathbf{r}_{ex}) \quad (\text{A.14})$$

Für das räumliche Integral der Intensität U am Ort der Beleuchtung \mathbf{r}_{ex} ergibt sich eine resultierende PSF h_{res} als Produkt von Detektions-PSF h_{det} und dem punktgespiegelten Beleuchtungsfleck h'_{ex} . In der Regel ist die PSF punktsymmetrisch, wodurch $h_{res} = h_{det} \cdot h_{ex}$ gilt.

Ein Bild der Probe lässt sich in der Konfokalmikroskopie durch Rastern des Beleuchtungsortes \mathbf{r}_{ex} über das Objekt bei gleichzeitigem Aufzeichnen der Lichleistung erhalten.

In der konfokalen Bildgebung ergibt sich die resultierende PSF also durch die bauartbedingte Begebenheit, dass der Detektor immer der Position des Beleuchtungsfleckes folgt. Dadurch, dass die resultierende PSF kleiner als die reine Detektions-PSF ist, verfügt das aufgenommene Bild ohne jede mathematische Nachbearbeitung über eine im Vergleich zur herkömmlichen Mikroskopie erhöhte Auflösung (siehe Abbildung 4.7). Da sich die Detektions-PSF aus der Faltung von Detektionsblende und Emissions-PSF hervorgeht (A.10), lässt sich das schärfste Bild erreichen, wenn die Blende möglichst weit geschlossen ist. Wenn man zusätzlich zur Punktsymmetrie der PSF annimmt, dass der Stokesshift der Fluoreszenz sehr klein ist ($\lambda_{ex} \approx \lambda_{em}$) und daher Anregungs- und Emissions-PSF

sehr ähnlich sind ($h_{ex} \approx h_{em} = h$) und man außerdem davon ausgeht, dass das Pinhole sehr viel kleiner ist, als die PSF, so erhält man für die resultierende PSF den bekannten quadratischen Zusammenhang

$$h_{res} \approx h^2 . \tag{A.15}$$

A.4 *Noise Amplification* bei Maximum-Likelihood-Entfaltung

Bei der Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode kann es zu einem verstärkten Einfluss des Rauschens auf die durch das Verfahren rekonstruierte Objektverteilung kommen. Die relative Stärke des Rauschens im errechneten Objekt ist dadurch also größer, als die relative Stärke im Bild (im Ensemble der Observablen). Dieses Phänomen wird mit dem englischen Begriff *noise amplification* bezeichnet. Um die Ursache der *noise amplification* im Folgenden verständlich zu machen, wird als Fallbeispiel ein möglichst einfaches lineares, verschiebungsinvariantes System herangezogen. Das abgebildete Objekt besteht hierzu lediglich aus zwei Unbekannten. Dies könnten in der Mikroskopie zum Beispiel zwei Fluorophorkonzentrationen an zwei benachbarten Orten sein.

$$\rho = \begin{pmatrix} \rho_1 \\ \rho_2 \end{pmatrix} \tag{A.16}$$

Im Bildgebungsprozess werden diese Unbekannten zu zwei Erwartungswerten von Observablen linearkombiniert. Hierbei soll in den Erwartungswert der ersten Observablen I_1 die erste Unbekannte mit der Gewichtung a und die zweite Unbekannte mit der Gewichtung b eingehen. In den Erwartungswert der zweiten Observablen I_2 geht umgekehrt die zweite Unbekannte mit a und die erste mit b ein. Diese Linearkombination lässt sich als Multiplikation mit der Faltungsmatrix H darstellen.

$$H\rho = I , \tag{A.17}$$

$$H = \begin{pmatrix} a & b \\ b & a \end{pmatrix} , \quad I = \begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \end{pmatrix} \tag{A.18}$$

Die Messwerte x_1 und x_2 der Observablen selbst genügen wiederum der Poisson-Statistik. In der Mikroskopie sind die beiden messbaren Werte beispielsweise die Photonennraten, welche auf zwei benachbarten Pixeln auftreten.

$$P(x_i) = \frac{I_i^{x_i}}{x_i!} \exp -I_i \tag{A.19}$$

Es wird angenommen, dass pro Observabler I_i nur ein Messwert x_i bekannt ist und dass die Koeffizienten der Faltungsmatrix bekannt sind. Um anhand dieser beiden Werte die wahrscheinlichste Objektverteilung zu bestimmen, lässt sich zunächst von der Wahrscheinlichkeitsfunktion für das Auftreten der Messwerte

$$P(x_1 \cap x_2) = P(x_1) \cdot P(x_2) = \frac{I_1^{x_1} I_2^{x_2}}{x_1! x_2!} \exp(-I_1 - I_2) \quad (\text{A.20})$$

durch Einsetzen der Objektwerte ρ_1 und ρ_2 in die Erwartungswerte I_1 und I_2 die Likelihoodfunktion für die Erwartungswerte bilden.

$$\begin{aligned} P(x_1 \cap x_2 | \rho) &= \frac{(a\rho_1 + b\rho_2)^{x_1} (b\rho_1 + a\rho_2)^{x_2}}{x_1! x_2!} \exp[-(a+b)(\rho_1 + \rho_2)] \\ &= L(\rho) \end{aligned} \quad (\text{A.21})$$

Um die Objektwerte zu bestimmen, für welche die Likelihoodfunktion maximal ist, wird für gewöhnlich die negative logarithmierte Likelihoodfunktion l minimiert.

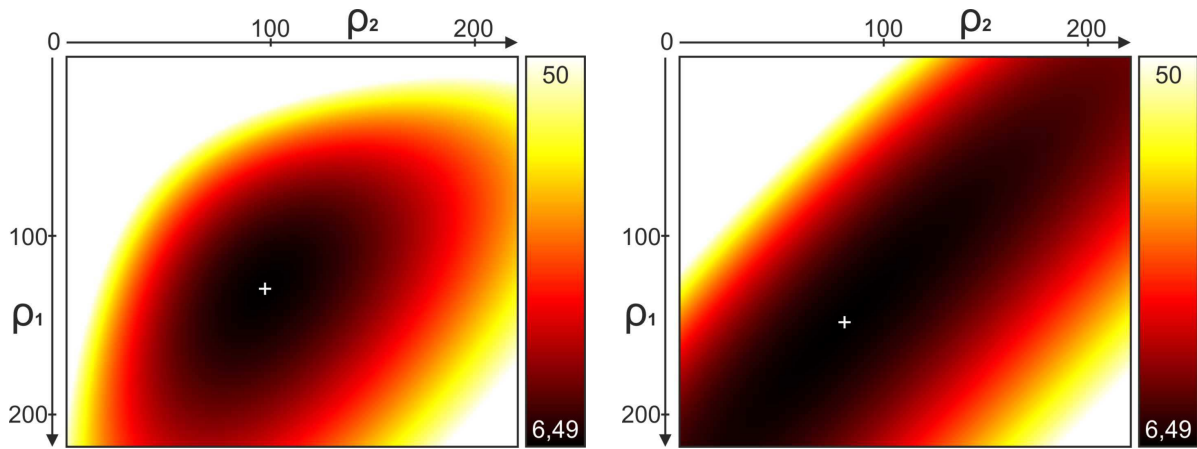
$$\begin{aligned} l(\rho) &= (a+b)(\rho_1 + \rho_2) - x_1 \log(a\rho_1 + b\rho_2) - x_2 \log(b\rho_1 + a\rho_2) \\ &\quad + \log(x_1!) + \log(x_2!) \end{aligned} \quad (\text{A.22})$$

Um den Effekt der „noise amplification“ zu verstehen, wird diese neg-log-Likelihoodfunktion für verschiedene PSFs untersucht. Hierzu wird der Fall angenommen, dass die tatsächlichen, nicht direkt messbaren, Objektwerte ρ_1 und ρ_2 , und die Erwartungswerte der beiden Bildpunkte I_1 und I_2 jeweils 100 betragen. Sowohl das Objekt, als auch das Bild sind hiermit also konstant. Dem Betrachter, der das wahre Objekt nicht kennt, ist dieser Sachverhalt jedoch nicht bekannt. Es wird eine Faltungsmatrix mit schmaler PSF H_s mit einer Faltungsmatrix mit breiter PSF H_b verglichen.

$$H_s = \begin{pmatrix} 0,8 & 0,2 \\ 0,2 & 0,8 \end{pmatrix}, \quad H_b = \begin{pmatrix} 0,6 & 0,4 \\ 0,4 & 0,6 \end{pmatrix} \quad (\text{A.23})$$

Bei der Faltung mit der breiteren PSF (der dichten Faltungsmatrix) wird die Objektinformation stärker gemischt, was zu einer niedrigeren Auflösung führt. Die Aufnahme mit den beiden PSFs soll jeweils für das erste Pixel den Wert $x_1 = 100$ und für das zweite Pixel den Wert $x_2 = 110$ liefern, was unter der Annahme der Poissonverteilung verhältnismäßig wahrscheinliche Werte sind. Der Messwert x_1 liegt damit genau auf dem Erwartungswert und der Messwert x_2 ist um 1σ in die positive Richtung verschoben. Abbildung A.1 zeigt

die Neg-log-Likelihoodfunktionen für die Objektwerte unter der Annahme dieser Messwerte bei den beiden gegebenen PSFs.



(a) neg-log-Likelihood bei schwacher Mischung (hoher Auflösung) (b) neg-log-Likelihood bei starker Mischung (niedriger Auflösung)

Abbildung A.1: neg-log-Likelihood für zwei Objektelemente, welche im Bildgebungsprozess durch die PSF gemischt werden und durch Poisson’sches Rauschen einen Fehler erfahren. Ist die Mischung stark und damit die Auflösung gering (b), so lässt sich der Einfluss der einzelnen Objektelemente auf das Bild nur schlecht separieren, wodurch im Vergleich zum Fall mit hoher Auflösung (a) das neg-log-Likelihoodfunktional breit und der Fehler der Extremwertbestimmung groß wird. Die Minima der Funktionale sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Alle Werte größer 50 sind weiß dargestellt.

Das Minimum der Likelihood bei Voraussetzung der schmalen PSF A_s liegt bei $\rho_s = \begin{pmatrix} 96,7 \\ 113,2 \end{pmatrix}$. Für die breite PSF A_b liegt das Minimum jedoch bei $\rho_b = \begin{pmatrix} 80,3 \\ 129,7 \end{pmatrix}$.

Bei der Maximum-Likelihood-Entfaltung handelt es sich per Definition um ein Invertierungsverfahren, welches den Einfluss des Rauschens bestmöglich berücksichtigt. Allerdings tritt auch hier praktisch immer eine Verstärkung des Fehlers auf.

Bei Betrachtung der grafisch dargestellten Likelihoodfunktionen (Abb. A.1) fällt außer der unterschiedlichen Lage der Minimalpositionen vor allem auf, dass die gesamte Verteilung bei der breiten PSF wesentlich unbestimmter entlang der Geraden ist, welche die Kombinationen von ρ_1 und ρ_2 repräsentiert, die die gleiche Summe $\rho_1 + \rho_2 = 210$ besitzen. Es ist bei niedriger Auflösung für die Likelihood also relativ egal, auf welche Weise sich die Intensität auf die beiden Objektpunkte verteilt, solange sie die Summe ergibt, welche durch die Summe der Bildwerte vorgegeben ist. Hiermit wird der Sachverhalt wiedergegeben, dass die Schätzung der wahrscheinlichsten Objektverteilung einer großen Ungenauigkeit unterliegt, wenn die PSF breit ist und daher die Objektinformation im Bildgebungsprozess stark vermischt wird.

Wenn dem Betrachter jedoch bekannt ist, dass das Objekt konstant ist, lässt sich diese Annahme in die Likelihoodfunktion einfügen und man erhält $\rho_1 = \rho_2 = 105$. Etwas ähnliches wird unternommen, wenn eine Regularisierung zur Rauschunterdrückung, wie

z.B. Good's Roughness oder Total Variation verwendet wird. Hierzu wird angenommen, dass das Objekt einigermaßen glatt oder Block-Artig ist, sich also nicht allzu stark bzw. nicht allzu häufig ändert. Zu diesem Zweck wird im Objekt eine häufige Änderung der Intensität bestraft, indem im Fall von Good's Roughness auf die Likelihoodfunktion das Quadrat des räumlichen Gradienten (Änderung der Intensität von Pixel zu Pixel) aufaddiert wird. Der Einfluss eines derartigen Regularisierungsterms auf die Likelihoodfunktion ist in Abbildung A.2 dargestellt. Bei den meisten Bildgebungsanwendungen kann man dadurch sehr gute Ergebnisse erzielen, weil in der Tat die Objekte auf einer kleinen Größen-, bzw. Pixelskala oft glatt sind. Dies ist zum Beispiel bei der Betrachtung von Planeten und ihren Monden der Fall oder generell bei der Bildgebung des an flächigen Objekten reflektierten Lichts. Ebenfalls sind die meisten in der Bildbearbeitung verwendeten Testbilder, wie Siemenssterne oder Portraits von Personen relativ glatt und profitieren daher stark von der Verwendung von Regularisierungen.

Da die Likelihood zwischen benachbarten Pixeln im Objektraum, welche stark durch die PSF zusammenwirken relativ indifferent ist, genügt ein geringer Einfluss eines Regularisierungsterms, um das Minimum der neg-log-Likelihoodfunktion nahe an den richtigen Ort zu rücken (Abb. A.2c).

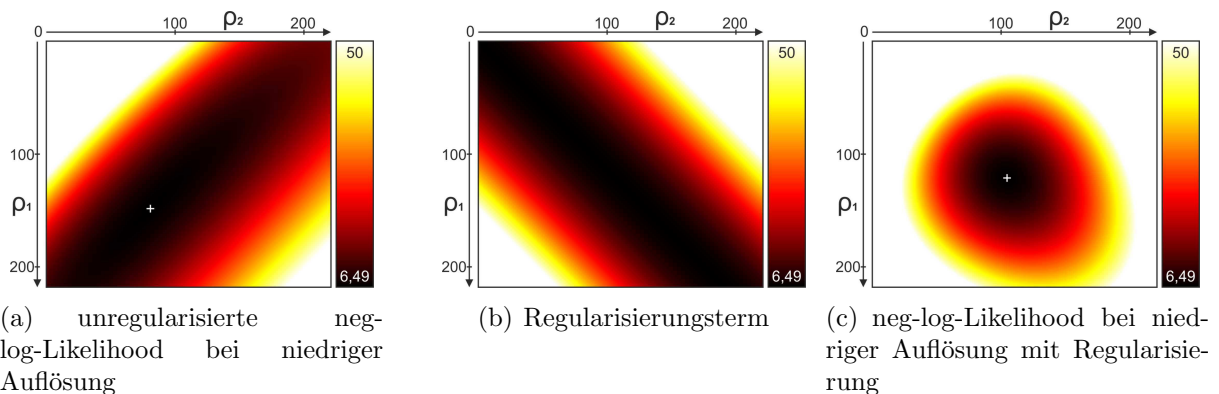


Abbildung A.2: Durch einen Regularisierungsterm (b) lässt sich der Einfluss des Rauschens reduzieren (c). Die verwendete Regularisierung (Good's Roughness) basiert auf der Annahme, dass der Unterschied zwischen den Objektpunkten klein ist. Abweichungen werden quadratisch bestraft. (alle Werte größer 50 sind weiß dargestellt)

Durch die Verwendung von Regularisierungstermen in der Entfaltung gelingt es sogar, „out-of-band-information“, also Objektinformation, welche außerhalb des auflösbaren Bereichs liegt, zu rekonstruieren. Auch zur Entfaltung von Mikroskopiebildern, insbesondere in der Fluoreszenzmikroskopie, wird für gewöhnlich eine Regularisierung verwendet. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass die verwendeten Regularisierungsterme auf der Annahme basieren, dass das Objekt glatt ist und/oder wenige scharfe Kanten besitzt. Gerade in der Fluoreszenzmikroskopie ist das Vertrauen auf derartige Annahmen im Allgemeinen unbegründet. Die Objekte bestehen aus einer Ansammlung einzelner Fluorophore, welche

wiederum diskrete Objekte, wie zum Beispiel Membran- oder Histonproteine markieren. Daher ist es insbesondere bei der Durchführung von quantitativen Untersuchungen auf Basis der Fluorophordichteverteilung, wie zum Beispiel durch Kreuzkorrelationsanalysen, als problematisch einzustufen, wenn die zugrunde liegenden Bilder unter Verwendung eines glättenden Regularisierungsterms entfaltet wurden.

A.5 Rahmendaten der klinischen Studie

Titel: Validierung von Funduskopie mit Strukturierter Beleuchtung an einem prototypischen Ophthalmoskop

Eudamen-Nummer: CIV-13-04-010401

Studienbeginn: 01.12.2013

Geplantes Studienende: 01.12.2014

Geplante Patienten-/Probandenzahl: 25

Geplante Anzahl der Anwendungen je Proband: bis zu 10

Primärziel der klinischen Prüfung/Leistungsbewertungsprüfung: Validierung der Methode

Probandenpopulation:

- Gesunde Probanden
- Patienten

Einschlusskriterien:

- freiwillige Teilnahme
- Fähigkeit des Teilnehmers, Wesen und Tragweite der klinischen Prüfung zu verstehen
- Personen die zu Beginn der Studie das 40. Lebensjahr erreicht haben

Ausschlusskriterien:

- Fortgeschrittene Katarakt
- ausgeprägte Medientrübungen anderer Art, schwere Hornhautnarben
- Demenz, geistige Behinderung
- Epilepsie

- Schwangerschaft / Frauen vor den Wechseljahren ohne Sterilisation und Stillende
- schwere körperliche Behinderung (z.B. Lähmung)
- Teilnahme an einer anderen interventionellen Studie bzw. Beobachtungszeitraum einer konkurrierenden Studie
- Gegenanzeigen der Mydriatika (z.B. primäres Glaukom, Allergie)

A.6 Teileliste Ophthalmoskop

Falls nicht anders deklariert, handelt sich bei den Preisen um Nettobeträge.

Laser:

Hersteller: Roithner Lasertechnik GmbH, Wien, Österreich

Modell: RLTMML-532-500-5, 532 nm, 500 mW cw stab 5%

Ausgangsleistung: 792,4 mW

Leistungsstabilität: 0,585%

Amplitudenrauschen: 0,7%

Transversale Mode: nah TEM₀₀

Strahldurchmesser (1/e²): X: 0,722 mm, Y: 0,854 mm

Strahldivergenz: 2 mrad

Kosten: 2000 €

Laserblende:

Hersteller: Uniblitz Shutter Systems, Rochester, NY 14625, USA

Modell: LS2Z2-NL

Beschichtung: AlSiO

Transferzeit Öffnen: 0,3 ms

Transferzeit Schließen: 0,5 ms

Kosten: 1110 €

Laserblendentreiber (Bestand):

Hersteller: Uniblitz Shutter Systems, Rochester, NY 14625, USA

Modell: D122

Kosten für alternativen Treiber VCM-D1: 741 €

SLM:

Hersteller: BBS Bildsysteme, Bad Wiessee, Deutschland

Modell: Epson D7 LCD Kit

Display: Epson L3C07U-85G10

Kosten: 1200 €

Graufilterrad:

Hersteller: Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

Modell: NDC-50C-4M

Durchmesser: 50 mm

Optische Dichte: 0 - 4,0

Kosten: 367,80 €

LED:

Hersteller: Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

Modell: LED635L

Wellenlänge: 635 nm

Halbwertsbreite des Spektrums: 15 nm

maximale Lichtleistung: 170 mW

maximaler Strom: 500 mA

Kosten: 48,59 €

Photodetektor:

Hersteller: Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

Modell: PDA36A

Funktionsweise: photodiodenbasiert

Verstellbereich Verstärkung: 8 x 10 dB Schritte

Ausgangsimpedanz: 50Ω

Ausgangsspannung: 0 bis 10 V

Kosten: 265,33 €

Optische Filter:

Hersteller: AHF Analysetechnik AG, Tübingen

Modelle:

HQ 545 LP Sperrfilter

LP 568 RS Sperrfilter

z532 RDC Strahlteiler

Gesamtkosten: 946 €

Computer:

PC: Intel Core i5 (Sockel 1156) basiert (500,12 €)

Bildschirm: 22 Zoll, 1920x1080 (132,66 €)

Gesamtkosten: 632,78 €

Ansteuerungsplatine:

Fertigung (unbestückt): Beta-LAYOUT GmbH, Aarbergen, Deutschland

Kosten: 56,15 €

Breadboard (Bestand)

Kosten für Äquivalent: etwa 1400 €

Kamera (Bestand)

Hersteller: PCO AG, Kelheim, Deutschland

Kosten für geeignete Kamera eines anderen Herstellers: ca. 5000 €

Optomechanik (größtenteils aus vorhandenen Teilen)

Hersteller: Quioptiq (ehemals Linos) Photonics GmbH & Co KG, Göttingen, Deutschland

Kosten für äquivalente Ausstattung: ca. 3000 €

Arduino Uno Mikrocontroller

Hersteller: Arduino

Kosten: 26,30 €

sonstige Kleinteile (Elektronikbauteile, etc.)

Kosten: ca. 100 €

Gesamtkosten

Kosten abzüglich der Bestandteile: ca. 6800 € brutto

Theoretische Kosten für eine Neuanschaffung aller Teile: ca. 19000 € brutto

*Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den

.....

(Gerrit Best)