

UNIVERSITÄT BIELEFELD
FACHBEREICH PHYSIK

**Multiphotonenmikroskopische
Untersuchungen und Kategorisierung
von humanem Knorpelgewebe sowie
2-Photonen-Mikroendoskopie**

Dissertation

vorgelegt von Thorsten Bergmann
geboren am 08. März 1981 in Bünde.

Gutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti
Prof. Dr. Thomas Huser

Bielefeld, 29. Dezember 2011

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Bielefeld, 29. Dezember 2011

Thorsten Bergmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Diagnostik von Knorpelschäden	1
1.2 Optische Technologien	3
1.3 Gegenstand der Arbeit	4
2 Grundlagen	7
2.1 Fluoreszenz	7
2.2 Absorption	8
2.3 Ultrakurze Laserpulse	14
2.4 Mikroskopie	20
2.5 Fluoreszenz-Lebenszeit Imaging (FLIM)	27
2.6 Mikroendoskopie	31
3 Knorpel	37
3.1 Aufbau und Struktur	37
3.2 Pathophysiologie des Gelenkknorpels	40
3.3 Beurteilung und Diagnostik eines Knorpelschadens	44
4 Experimentelle Methoden	47
4.1 Aufbau des 2-Photonen Laser-Scanning Mikroskops	47
4.2 Fluoreszenz-Lebenszeit Imaging (FLIM) Aufbau	52
4.3 Mikroendoskopischer Aufbau	53
5 Bildauswertung	57
5.1 Wavelet-Analyse	57
5.2 Methoden zur Dimensionsreduzierung	67

6	Ergebnisse	73
6.1	Lokalisierte Photoaktivierung	73
6.2	2-PLSM von humanem hyalinen Knorpelgewebe	81
6.3	Endoskopischer Aufbau	95
6.4	Wavelet-basierte Bildanalyse	102
6.5	Wavelet-Analyse von 2-Photonen Mikroskopaufnahmen von humanem Knorpelgewebe	110
7	Diskussion und Ausblick	123
8	Zusammenfassung	127
9	Literaturverzeichnis	129

Abkürzungsverzeichnis

AFM	engl. Atomic force microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
CARS	engl. Coherent anti-Stokes Raman scattering (Kohärente anti-Stokes Raman Streuung)
CLSM	engl. Confocal laser-scanning microscopy (Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie)
CT	Computertomographie
FLIM	engl. Fluorescence lifetime imaging (Fluoreszenz Lebenszeit Bildgebung)
FWHM	engl. Full width half maximum (Halbwertsbreite)
GRIN-Linse	Gradienten-Index Linse
HMG proteins	engl. High mobility group proteins
IRF	engl. Instrument response function (Instrumentenantwortfunktion)
MEMS	engl. microfabricated micromechanical systems
MRT	Magnetresonanztomographie
NIRS	nah-infrarot Spektroskopie
OCT	engl. Optical coherence tomography (Optische Kohärenz Tomografie)
PALM	engl. Photoactivated localization microscopy
PCA	engl. Principal component analysis (Hauptkomponentenanalyse)
ROI	engl. Region of interest
SHG	engl. Second harmonic generation
SOM	engl. Self-organising map (Selbstorganisierende Karte)
SR-SIM	engl. Structured illumination microscopy
STED	engl. Stimulated emission depletion microscopy
TCSPC	engl. Time correlated single-photon counting (Zeitkorrelierte Einzel-Photonzählung)
TPLSM	engl. Two-photon laser-scanning microscopy (2-Photonen Laser-Scanning Mikroskopie)

Abbildungsverzeichnis

2.1	Jablonski-Diagramm	8
2.2	Besetzungsverteilung im thermischen Gleichgewicht	9
2.3	Übergangswahrscheinlichkeit	13
2.4	fs-Pulse	15
2.5	Pulskompressor	19
2.6	<i>point-spread-function</i>	22
2.7	Prinzip der CLSM	23
2.8	PSF verschiedener Szenarien	25
2.9	Fluoreszenzanregung CLSM und TPLSM	26
2.10	Signale TCSPC	29
2.11	IRF Photodetektoren	30
2.12	Scaneinheiten Mikroendoskopie	33
2.13	Strahlengang GRIN-Linse	33
3.1	Histologischer Aufbau Gelenkknorpel	41
3.2	Histologische Arthrosestadien	45
4.1	Aufbau 2-Photonen Laser-Scanning Mikroskop	48
4.2	Multifokaler multispektraler descanned Aufbau	51
4.3	Autokorrelationsfunktion	52
4.4	Aufbau FLIM-System	54
4.5	Faserbündelende	55
4.6	Aufbau 2-Photonen Laser-Scanning Mikroendoskop	56
5.1	Wavelet-Funktionen	58
5.2	Prinzip Fourier-Transformation	58
5.3	Prinzip Wavelet-Transformation	59
5.4	Haarsche Skalierungsfunktion	60
5.5	Funktion mit Skalierungsfunktion	61

5.6	Mittelwertfunktion und Skalierungsfunktion	62
5.7	Approximationsfunktionen	63
5.8	2-dimensionale Pixelwerte	65
5.9	Wavelet-Analyse Testobjekt	66
5.10	Prinzip SOM	68
5.11	Schema Hauptkomponentenanalyse	71
6.1	Tabak-Protoplast in Hellfeldaufnahme und ds-red Lokalisation	75
6.2	paGFP Aktivierung	76
6.3	Zeitverläufe Fluoreszenzintensität	78
6.4	Zeitverläufe Fluoreszenzintensität mit Fit	80
6.5	Zellen einer Orangenhaut im MMM-Modus	83
6.6	Spektrale Kalibration	84
6.7	2-Photonen Knorpeligenfluoreszenz	85
6.8	Intensitätsverläufe Eigenfluoreszenz Knorpel	87
6.9	Fluoreszenz Knorpel, spektral aufgelöst	88
6.10	Einteilung von Knorpelproben in Outerbridge-Kategorie	91
6.11	Abklingkurve Rhodamin 6G	92
6.12	FLIM-Darstellung Polle	93
6.13	FLIM-Darstellung Knorpelgewebe	94
6.14	Auflösungsvermögen Mikroendoskop	96
6.15	Auswertung USAF Testtarget	97
6.16	Mikroendoskopische Fluoreszenzaufnahmen	98
6.17	Mikroendoskopische Aufnahmen, Ficus Benjamini	99
6.18	Intensitätsverläufe zur Kontrastbestimmung	100
6.19	Nachweis 2-Photonenabsorption	101
6.20	Mikroendoskopische Aufnahme von humanem Knorpelgewebe	102
6.21	Kategorisierung TPLSM-Aufnahmen von humanem Knorpelgewebe	104
6.22	Prinzip Komponentenkarten	107
6.23	Geclusteter Testdatensatz	108
6.24	Hit-Statistik Testdatensatz	109
6.25	Einsortierung Originalbilder in SOM	111
6.26	Komponentenkarten kleiner Datensatz	112
6.27	Auswertung Analyse kleiner Datensatz	113
6.28	Hit-Statistik kleiner Datensatz	114
6.29	Komponentenkarten großer Datensatz	115

6.30	Auswertung großer Datensatz	116
6.31	Hit-Statistik großer Datensatz	117
6.32	SOM mit Originalbildern großer Datensatz	119
6.33	Vergleich markoskopische Bilder mit Hit-Statistik	122

Tabellenverzeichnis

3.1	Outerbridge Klassifikation von Knorpelschäden	44
6.1	Messwerte Kontrastverhältnis USAF Testtarget	97
6.2	SNR endoskopische Aufnahmen von <i>ficus benjamini</i>	100
6.3	Automatisierte Einteilung von Knorpelzuständen	120

1 Einleitung

Der Begriff Arthrose (Syn. Arthrosis deformans – altgriech. *ἄρθρον* „Gelenk“ und lat. *deformare* „verstümmeln“) bezeichnet in Deutschland einen über das durch die normale Alterung bedingte Maß hinausgehenden Gelenkverschleiß [Mart, 2009].

90% der Menschen über 65 Jahre haben einen arthrotischen Gelenkverschleiß. Besonders ernst zu nehmen ist diese Tatsache vor dem Hintergrund, dass unsere Gesellschaft immer älter wird. So werden im Jahr 2030 36% der Bevölkerung über 65 Jahre alt sein [Ärzte, 2008]. Die gesetzlichen Krankenkassen geben derzeit jährlich etwa 2,6 Milliarden Euro bei ca. 15 Millionen behandlungsbedürftigen Patienten in Deutschland aus. In der europäischen Union betragen die Ausgaben für dieses Krankheitsbild etwa 14,7 Milliarden Euro.

In Deutschland wurden 2007 ungefähr 368.000 Patienten stationär wegen Arthrosebeschwerden behandelt und es wurden etwa 155.000 Knieprothesen eingesetzt. Aufgrund dieser Tatsache liegt eine hohe sozialmedizinische Bedeutung vor.

Ausgangspunkt einer Arthrose ist ein Schaden im Gelenküberzug, der sogenannte Knorpelschaden [DAH, 2011]. Ein solcher Knorpelschaden wird auch als Frühstadium einer Arthrose bezeichnet. Von einer Arthrose spricht der Mediziner, wenn Knochenveränderungen in Bezirken, die direkt unter dem erkrankten Knorpel liegen, auftreten.

1.1 Diagnostik von Knorpelschäden

Der Gelenkknorpel ist für klinische Untersuchungen nur schwer zugänglich. Die Standarduntersuchung des Kniegelenks ist nach wie vor die Röntgenuntersuchung [Zac, 2007]. Mit ihr ist jedoch eine direkte Bildgebung des Knorpels nicht möglich. Es können lediglich indirekte Rückschlüsse aus diagnostizierter Gelenkspaltverschmälerung, subchondraler Sklerosen oder Zysten und osteophytärer Anbauten gezogen werden. Eine Bewertung und Klassifizierung der radiologischen Aufnahmen wird zumeist anhand der Kellgren-

Klassifizierung vorgenommen [Kel, 1957]. Die Computertomographie (CT) basiert ebenfalls auf der Bestrahlung mittels Röntgenstrahlen, es können jedoch Schnittbilder (mit einer Schichtdicke bis 0,4 mm) sowie dreidimensionale Bilder erstellt werden. Die Bewertungen der CT-Befunde basieren jedoch auf den gleichen physikalischen Prinzipien wie das röntgenologische Summationsbild und spielen bei der Arthrodiagnostik eher eine untergeordnete Rolle.

In den letzten Jahren hat sich die Bildgebung der Kernspintomographie (MRT) etabliert. Sie hat den Vorteil, nichtinvasiv alle Gelenk- und Knorpelflächen visuell darstellen zu können. Eine Bestimmung des Knorpelvolumens sowie der Knorpeldicke sind mit dieser Diagnostik möglich. Da jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen dem Knorpelvolumen und der Knorpelqualität [Cal, 2004], [Kla, 1999] sowie zusätzlich kein linearer Zusammenhang zwischen dem Knorpelverlust und der Progression der Arthrose besteht [Saa, 2005], ist die Diagnostik mit dieser Technologie limitiert.

Die derzeit aussagekräftigste Untersuchungsmethode eines Knorpelschadens ist die Arthroskopie. Insbesondere die Knorpeloberfläche kann mit dieser Methode am exaktesten beurteilt werden. Eine große Interobservervarianz macht eine Diagnostik stark abhängig von der Erfahrung des behandelnden Arztes und behindert die Knorpelbeurteilung von Arthroscopiebefunden bei der gutachterlichen Verwendung [Jer, 1997].

Derzeit ist jedoch keine der gängigen Diagnosemethoden in der Lage, das Initialstadium einer Arthrose erfassen zu können. Eine fortschreitende Arthrose kann jedoch mit den gängigen Methoden bzw. aus einer Kombination hinreichend diagnostiziert werden.

Bei einer Krankheit mit einer derartigen Auswirkung auf die Gesellschaft bzw. das Gesundheitssystem, gibt es natürlich viele Anstrengungen in der Forschung um neue Diagnose- und Behandlungsmethoden zu entwickeln. Die optische Kohärenztomographie (OCT) und die Rasterkraftmikroskopie (AFM) sind zwei neue Ansätze zur Untersuchung von menschlichem Knorpelgewebe.

Die OCT ist ein Untersuchungsverfahren, das auf dem Prinzip eines Interferometers basiert. Kurzkohärentes Licht wird in einen Referenzarm und einen Probenarm aufgespalten. Durch interferometrische Messung der Laufzeiten kann ein Bild der Probe erstellt werden. Vor allem die, für ein optisches Verfahren, große Eindringtiefe ist ein Vorteil dieser Methode. Optische Oberflächenreflektionsmessungen und Oberflächenrauigkeitsmessungen wurden von [Saa, 2009] an Knorpelgewebe erfolgreich getestet.

[Sto, 2009] haben mit einem AFM strukturelle, molekulare Veränderungen von Knorpel

in einem sehr frühen Stadium der Arthrose messen können. Es bestehen die Bestrebungen, ein AFM zur arthroskopischen Untersuchung von Knorpelgewebe zu entwickeln.

Darüber hinaus gibt es eine aktuelle Untersuchung von humanem Knorpelgewebe mittels nah-infrarot Spektroskopie (NIRS) [Hof, 2010]. In [Bro, 2008] wurde der Einfluss von Kryoprozessen auf Knorpelgewebe mittels 2-Photonen Mikroskopie kombiniert mit SHG untersucht und eine Korrelation zwischen der SHG-Signal Intensität und der metabolischen Zellaktivität hergestellt. Durch eine Kombination mit einer weiteren Mikroskopietechnik, der CARS-Mikroskopie (coherent anti-Stokes Raman scattering), wurde das Elastinnetzwerk des Knorpelgewebes untersucht [Man, 2009].

1.2 Optische Technologien

Licht ist ein wesentlicher Bestandteil für die Grundlage von Leben auf der Erde und die Erfindung der Glühbirne im 19. Jahrhundert wird nach wie vor als eine der wichtigsten Erfindungen der Menschheit angesehen. Heutzutage kann Licht weitaus mehr, als Räume und Straßen zu beleuchten. Es wird in jeder Supermarktkasse zum Scannen des Barcodes eingesetzt, die Autoindustrie nutzt es zur Fertigung ihrer Produkte und in den Naturwissenschaften und der Medizin ist es vielerorts ein unverzichtbares Hilfsmittel und Werkzeug geworden. Die allermeisten neuartigen Anwendungen von Licht basieren auf dem Laser. Diese faszinierende Lichtquelle ermöglicht es, Licht auf einen Raumbereich mit Ausdehnungen von wenigen Nanometern zu fokussieren oder Lichtpulse von 12 Attosekunden ($12 \cdot 10^{-18}$ s) zu erzeugen [Kok, 2010]. Fast logischerweise erhielt der Laser auch Einzug in die Mikroskopie. Das Auflösungsvermögen optischer Mikroskopie wird durch die Beugungsbegrenzung limitiert. Doch mit modernen Technologien ist es gelungen, auch diese als zunächst unüberwindbar wirkende Grenze zu unterschreiten. Techniken wie STED (stimulated emission depletion microscopy, [Hell, 1994]), PALM (Photoactivated Localization Microscopy, [Bet, 2006], [Hes, 2006]) oder SR-SIM (structured illumination microscopy, [Gus, 2008]) sind in diesem Zusammenhang zu nennen.

Licht kann nicht nur mit der Laser-Technologie auf immer unterschiedlichere Art und Weise erzeugt werden, es kann auch mit Hilfe von optischen Fasern nahezu beliebig geführt und übertragen werden. Auch hier hat die Entwicklung einen rasanten Verlauf genommen. Für das Internet werden immer größere Bandbreiten über die gesamte Erde übertragen, es können immer feinere Fasern und auch strukturierte Lichtleiter hergestellt werden. Ultradünne Fasern können mit einem Durchmesser von wenigen hundert nm

hergestellt werden. Photonische Kristallfasern [Rus, 2004] sind eine neue Klasse von optischen Fasern mit Anwendungen in der Übertragung hoher Leistungen. Sie können darüber hinaus sogar als Weißlichtquelle dienen [Wad, 2002].

Der Erfolg von Hochtechnologien hängt entscheidend von den damit erzielten Anwendungen ab. Die Idee wurde zu einem Patentantrag ausgearbeitet und beim deutschen Patentamt eingereicht.

1.3 Gegenstand der Arbeit

In dieser Arbeit wurden moderne, biophotonische Technologien dazu eingesetzt, eine Hilfestellung bei der Diagnose einer Volkskrankheit, der Arthrose, zu leisten. Die große Variabilität der eingesetzten Technologien konnte darüber hinaus für weitere biophysikalische Fragestellungen angewendet werden.

Im ersten Kapitel dieser Arbeit werden die theoretischen Grundlagen betrachtet. Zunächst werden die physikalischen Prozesse Fluoreszenz und Absorption eingehend behandelt. Anschließend werden ultrakurze Laserpulse und deren Ausbreitung beschrieben. Im Folgenden werden moderne Mikroskopiemethoden wie die konfokale Mikroskopie, die multiphotonen Mikroskopie sowie die Fluoreszenz-Lebenszeit Mikroskopie ebenso eingeführt wie der aktuelle Stand der Technik der Mikroendoskopie. Dem Aufbau von Knorpelgewebe und dem Verlauf des Krankheitsbildes der Arthrose ist das nächste Kapitel gewidmet. Die experimentellen Methoden mit den verschiedenen Systemaufbauten für die unterschiedlichen Anwendungen sind im Kapitel 4 dargestellt. Im Speziellen sind dies die non-descanned Kamera bzw. PMT Detektion, die multifokale, multispektrale descanned Detektion, die Fluoreszenz-Lebenszeit Mikroskopie sowie die 2-Photonen Mikroendoskopie. Neben den experimentellen Arbeiten ist die Bildverarbeitung bzw. -auswertung der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit. Die Grundzüge der verwendeten Methoden zur Auswertung der 2-Photonen Knorpelaufnahmen werden im Kapitel 5 betrachtet. Hier sind vor allem die wavelet-Transformation und selbstorganisierende Karten zu nennen.

Das erste gezeigte Ergebnis in Kapitel 6 ist die lokalisierte Photoaktivierung, bei der ein photoaktivierbares Fluoreszenzmolekül gezielt aktiviert wird, um anschließend seine Dynamik innerhalb einer lebenden Pflanzenzelle beobachten zu können. In der Auswertung können Aussagen über das zeitliche Verhalten der betrachteten Moleküle getroffen werden. Danach werden verschiedene biophotonische Aufnahmetechniken gezeigt mit denen

unterschiedliche Parameter über humanes Knorpelgewebe gewonnen werden können. Im Speziellen sind dies die Fluoreszenzintensität des Gewebes, die spektrale Charakteristik sowie die Lebenszeit der Fluoreszenz und die 2-dimensionale bzw. 3-dimensionale Verteilung des Fluoreszenzsignals welche für die Bildgebung genutzt wird.

Für die Auswertung dieser Morphologien wird anschließend die Wavelet-Transformation zur Extraktion von multidimensionalen Merkmalsvektoren verwendet. Diese können mit der Verwendung von dimensionsreduzierenden, selbstorganisierenden Karten dargestellt werden. Ziel der Bildauswertung ist eine objektive Kategorisierung des Knorpelgewebes in die Fortschrittsstadien einer Arthrose. In der Validierung der Analyse ist ein Vergleich mit makroskopischen Befunden des Knorpelgewebes enthalten. Eine Möglichkeit, um diese Art der objektiven Knorpelbewertung dem klinischen Alltag einen Schritt näher zu bringen, ist die 2-Photonen Mikroendoskopie. Hier werden erste Ergebnisse zu verschiedenen Proben, die mit der Mikroendoskopie aufgenommen werden, gezeigt. Gefolgt werden die Ergebnisse von einer abschließenden Diskussion samt eines Ausblicks.

2 Grundlagen

2.1 Fluoreszenz

Der Begriff Fluoreszenz wurde vom fluoreszierenden Mineral Fluorit abgeleitet. Der Prozess der Fluoreszenz bildet die Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopiemethoden.

Ein Atom oder ein Molekül wird durch ein Photon mit passender Energie $h \cdot \nu$ vom Grundzustand E_0 in einen elektronisch angeregten Zustand E_i gebracht. Dies geschieht in einem Zeitfenster von 10^{-15} Sekunden. Es erfolgt zunächst ein strahlungsloser Zerfall, bis das System im elektronisch angeregten Zustand den Grundzustand der Kernbewegung erreicht hat [Por, 2000]. Die frei werdende Energie wird in Form von Wärme innerhalb von 10^{-14} bis 10^{-11} Sekunden abgegeben. Das Atom oder das Molekül geht nach typischerweise 10^{-9} bis 10^{-7} Sekunden spontan unter Emission eines Photons mit der Energie $h \cdot \nu_{ij}$ in einen tieferen Energiezustand E_j über. Dieses Photon wird Fluoreszenzphoton genannt. Dieser Zustand kann über dem Grundzustand E_0 liegen und geht entweder durch weitere Photonenemission oder durch inelastische Stöße in den Grundzustand zurück. Die Zeitskala für diesen Übergang liegt bei 10^{-12} Sekunden. Der gesamte Vorgang ist in Abbildung 2.1 in einem Jablonski-Diagramm dargestellt.

Die spontane Übergangswahrscheinlichkeit vom Zustand E_i in den energetisch niedrigeren Zustand E_j wird mit dem Einstein-Koeffizienten A_{ij} beschrieben [Dem, 2005]

$$A_{ij} = \frac{2}{3} \frac{e^2 \omega_{ij}^3}{\epsilon_0 c^3 \cdot h} \cdot \left| \int \psi_i^* \mathbf{r} \psi_j d\tau \right|. \quad (2.1)$$

Sind N_i Atome in den angeregten Zustand gebracht worden, so wird die mittlere Leistung $\langle P_{ij} \rangle$

$$\langle P_{ij} \rangle = N_i \cdot A_{ij} \cdot h \cdot \nu_{ij} \quad (2.2)$$

abgestrahlt. Die zeitliche Veränderung der Besetzungsdichte des angeregten Zustands im

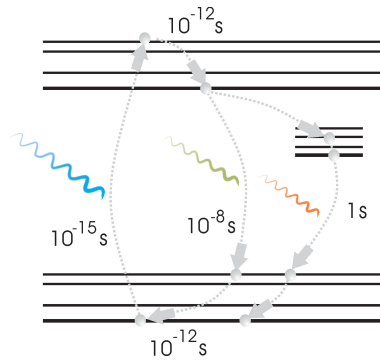


Abbildung 2.1: Übergänge und Lebenszeiten eines Fluoreszenzmoleküls (Jablonski Diagramm)

Intervall dt wird ausgedrückt durch

$$dN_i = -A_{ij}N_i dt. \quad (2.3)$$

Kann der angeregte Zustand in mehrere energetisch tiefere Zustände zerfallen, geht die Summe der Einstein-Koeffizienten $\sum_j A_{ij}$ in die Berechnung ein. Eine Integration liefert die zeitliche Besetzungsdichte des angeregten Zustands

$$N_i(t) = N_i(0) \cdot e^{-\sum_j A_{ij}t}. \quad (2.4)$$

Sie sinkt im thermischen Gleichgewicht nach der Anregung exponentiell mit der Zeit ab, bis jedes angeregte Atom oder Molekül wieder in den energetisch niedrigeren Zustand übergegangen ist und somit die Besetzungsdichte auf Null gesunken ist. Dieses Verhalten ist in Abbildung 2.2 zu sehen.

Die mittlere Lebensdauer τ_i des angeregten Zustands gibt die Zeit an, in der die Besetzungsdichte des angeregten Zustands auf das $1/e$ -fache abgefallen ist. Die reziproke Lebensdauer entspricht dem Einstein-Koeffizienten für die spontane Emission [Eic, 2006]

$$A_{ij} = \frac{1}{\tau_i}. \quad (2.5)$$

2.2 Absorption

Die 2-Photonen Absorption wird im Folgenden mit einem störungstheoretischen Ansatz [Nak, 1999], [Lou, 2000], [Arl, 2004] berechnet. Ein Zwischenergebnis auf dem Weg zur 2-

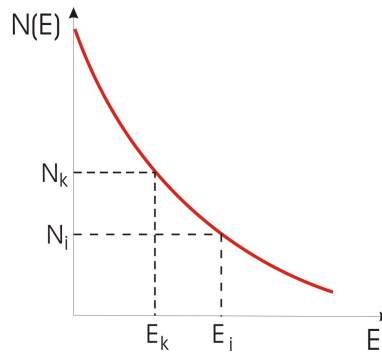


Abbildung 2.2: Besetzungsverteilung von Zuständen im thermischen Gleichgewicht (nach [Dem, 2005])

Photonen Absorption wird zunächst die Absorption eines Photons sein. In der genannten Literatur werden zum Teil unterschiedliche Nomenklaturen verwendet.

2.2.1 1-Photonen Absorption

Es sei:

- $\hat{H} \hat{=}$ Hamiltonoperator
- $|n\rangle \hat{=}$ Eigenzustand des Hamiltonoperators
- $E_n \hat{=}$ Eigenwert zum Eigenzustand $|n\rangle$
- $|i\rangle \hat{=}$ Anfangszustand
- $|f\rangle \hat{=}$ Endzustand

Für ein isoliertes Atom, das keiner elektromagnetischen Strahlung ausgesetzt ist, besitzt die Wellengleichung eine Lösung der Form

$$\psi(x, t) = f(t) \cdot \psi(x) = e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} \psi(x). \quad (2.6)$$

Die zeitabhängige Wellenfunktion $\psi(x, t)$ wird also in eine zeitunabhängige Wellenfunktion $\psi(x)$ und einen zeitabhängigen Phasenfaktor separiert. Desweiteren kann ein Zustand als Summe seiner Eigenzustände geschrieben werden

$$\psi(x) = \sum_n c_n(t) \psi_n(x) = \sum_n c_n(t) |n\rangle. \quad (2.7)$$

Mit diesen beiden Gleichungen kann der stationäre Zustand $\psi(x, t)$ durch

$$\psi(x, t) = \sum_n c_n(t) |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} \quad (2.8)$$

ausgedrückt werden. Befindet sich ein Atom in einem stationären Zustand, so verbleibt es für alle Zeiten in diesem. Besitzt ein Atom zwei stationäre Zustände $|1\rangle$ und $|2\rangle$, so lauten diese explizit

$$\psi_1(x, t) = c_1(t) |1\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_1 t} \quad \text{und} \quad \psi_2(x, t) = c_2(t) |2\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_2 t} \quad (2.9)$$

mit den entsprechenden Eigenwertgleichungen

$$\hat{H}\psi_1(x) = E_1\psi_1(x) \quad \text{und} \quad \hat{H}\psi_2(x) = E_2\psi_2(x). \quad (2.10)$$

Wird ein solches Atom einer elektromagnetischen Strahlung ausgesetzt, so wird dieses aufgrund der elektromagnetischen Energie gestört. Dies drückt sich durch einen zusätzlichen Hamilton-Operator aus und die zeitabhängige Schrödingergleichung (SG) lautet

$$(\hat{H} + \hat{H}_1)\psi(x, t) = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(x, t). \quad (2.11)$$

\hat{H} ist der Hamilton-Operator des ungestörten Systems, \hat{H}_1 der des gestörten Systems. Einsetzen der Wellenfunktion (Gl. 2.8) in die zeitabhängige SG liefert

$$(\hat{H} + \hat{H}_1) \sum_n c_n(t) |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \sum_n c_n(t) |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} \quad (2.12)$$

$$= i\hbar \sum_n |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} \frac{\partial c_n(t)}{\partial t} \quad (2.13)$$

$$+ \sum_n c_n(t) E_n |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t}. \quad (2.14)$$

Da gemäß der verwendeten Notation gilt:

$$\hat{H} |n\rangle = E_n |n\rangle \quad (2.15)$$

kann eingesetzt werden, die jeweiligen Terme heben sich gegenseitig auf und es ergibt sich:

$$\sum_n c_n(t) \hat{H}_1 |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} = i\hbar \sum_n \frac{\partial c_n(t)}{\partial t} |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} \quad (2.16)$$

Diese Gleichung kann nun von der linken Seite mit dem Endzustand f multipliziert werden:

$$\sum_n c_n(t) \langle f | \hat{H}_1 |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} = i\hbar \sum_n \frac{\partial c_n(t)}{\partial t} \langle f |n\rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} \quad (2.17)$$

Die Integration liefert

$$\langle f | \hat{H}_1 | n \rangle = \int_0^x \psi_f^* \hat{H} \psi_n dx \quad (2.18)$$

$$\langle f | n \rangle = \int_0^x \psi_f^* \psi_n dx = \delta_{fn} = \begin{cases} 0 & \text{für } f \neq n \\ 1 & \text{für } f = n \end{cases} \quad (2.19)$$

Auf der rechten Seite verschwindet das Skalarprodukt bis auf den Fall $f = n$. Somit können die Indizes der rechten Seite umgeschrieben werden:

$$\sum_n c_n(t) \langle f | \hat{H}_1 | n \rangle e^{-\frac{i}{\hbar} E_n t} = i\hbar \sum_n \frac{\partial c_f(t)}{\partial t} e^{-\frac{i}{\hbar} E_f t} \quad (2.20)$$

$$\frac{\partial c_f(t)}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} \sum_n c_n(t) \langle f | \hat{H}_1 | n \rangle e^{-\frac{i}{\hbar} (E_f - E_n) t} \quad (2.21)$$

Die Übergangsfrequenz zwischen den beiden Zuständen ist $\omega_{fn} = \frac{E_f - E_n}{\hbar}$ und kann eingesetzt werden:

$$\frac{\partial c_f(t)}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} \sum_n c_n(t) \langle f | \hat{H}_1 | n \rangle e^{-i\omega_{fn} t} \quad (2.22)$$

Zur Zeit $t = 0$ sei das System im Grundzustand $|n\rangle = |i\rangle$ und es gelte

$$c_n(t = 0) = \delta_{ni} = \begin{cases} 1 & \text{für } n = i \\ 0 & \text{für } n \neq i \end{cases} \quad (2.23)$$

Gleichung 2.23 sagt aus, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ nur ein Anfangszustand existiert, der mit der Wahrscheinlichkeit 1 besetzt ist. Somit eliminiert sich die Summe in 2.22 und es ergibt sich:

$$\frac{\partial c_f(t)}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} \langle f | \hat{H}_1 | i \rangle e^{-i\omega_{fi} t} \quad (2.24)$$

$$c_f(t) = -\frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle f | \hat{H}_1(t') | i \rangle e^{i\omega_{fi} t'} dt' \quad (2.25)$$

Die Wahrscheinlichkeit, das System im Zustand $|f\rangle$ anzutreffen, ist das Quadrat von $c_f(t)$

$$|c_f(t)|^2 = \left| -\frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle f | \hat{H}_1(t') | i \rangle e^{i\omega_{fi} t'} dt' \right|^2 \quad (2.26)$$

Die entsprechende Übergangswahrscheinlichkeit lautet:

$$\frac{|c_f(t)|^2}{t} = \frac{1}{t} \left| -\frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle f | \hat{H}_1(t') | i \rangle e^{i\omega_{fi} t'} dt' \right|^2 \quad (2.27)$$

Die bisher verwendete Störung kann weiter konkretisiert werden. Die Lichteinstrahlung auf das Atom wird durch einen Laser mit einer Amplitude entlang der x-Achse von $F (\exp(i\omega t) + \exp(-i\omega t))$ realisiert. Für das Atom wird ein elektrisches Dipolmoment von $p = ex$ angenommen. Der Hamiltonian für die Störung lautet somit:

$$\hat{H}_1 = exF \left(e^{i\omega t} + e^{-i\omega t} \right) \quad (2.28)$$

Einsetzen in 2.25 ergibt:

$$c_f(t) = -\frac{i \cdot eF}{\hbar} \int_0^t \langle f | \hat{x}_1 | i \rangle \left(e^{i(\omega_{fi} + \omega)t'} + e^{i(\omega_{fi} - \omega)t'} \right) dt' \quad (2.29)$$

$$= -\frac{i \cdot eF}{\hbar} \langle f | x | i \rangle \left(\frac{e^{i(\omega_{fi} + \omega)t} - 1}{i(\omega_{fi} + \omega)} + \frac{e^{i(\omega_{fi} - \omega)t} - 1}{i(\omega_{fi} - \omega)} \right) \quad (2.30)$$

Wird angenommen, dass $\omega \approx \omega_{fi}$ ist, also das eingestrahelte Licht eine Frequenz nahe der Übergangsfrequenz besitzt, kann der erste Term in Gl. 2.30 vernachlässigt werden (rotating wave approximation (RWA)).

$$c_f(t) = -\frac{i \cdot eF}{\hbar} \langle f | x | i \rangle \frac{e^{i(\omega_{fi} - \omega)t} - 1}{i(\omega_{fi} - \omega)} \quad (2.31)$$

Quadrieren ergibt wieder die Übergangswahrscheinlichkeit:

$$|c_f(t)|^2 = \left(\frac{eF}{\hbar} \langle f | x | i \rangle \right)^2 \left| \frac{e^{i(\omega_{fi} - \omega)t} - 1}{i(\omega_{fi} - \omega)} \right|^2 \quad (2.32)$$

$$= \left(\frac{eF}{\hbar} \langle f | x | i \rangle \right)^2 \frac{\sin^2(\omega_{fi} - \omega) \frac{t}{2}}{\left(\frac{1}{2}(\omega_{fi} - \omega) \right)^2} \quad (2.33)$$

Eine Darstellung der Übergangswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der eingestrahelten Frequenz ist in Abb. 2.3 dargestellt¹.

2.2.2 2-Photonen Absorption

Nachdem die Übergangswahrscheinlichkeit für ein Photon berechnet wurde, soll nun die 2-Photonen Absorption näher betrachtet werden.

Zusätzlich zu den beiden bisher betrachteten Zuständen eines Atoms, dem Grundzustand $|i\rangle$ und dem angeregten Zustand $|f\rangle$, gebe es noch einen zusätzlichen virtuellen

¹Notation: Die Übergangsfrequenz ω_{fi} im Text entspricht ω_1 in Abb. 2.3

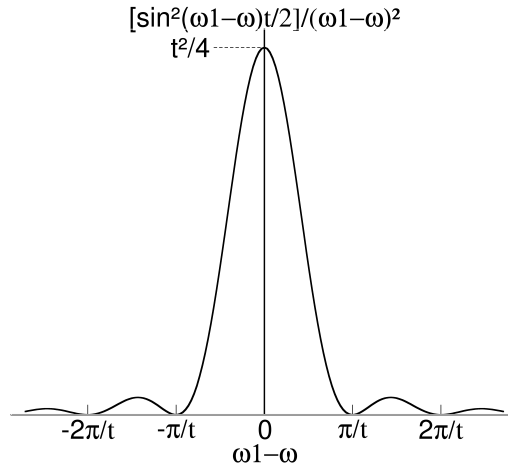


Abbildung 2.3: Graphische Darstellung der Übergangswahrscheinlichkeit $[\sin(\omega_1 - \omega)^2 t/2]/(\omega_1 - \omega)^2$ gegen $(\omega_1 - \omega)$. Das Maximum ist für $\omega_1 = \omega$ erreicht, also wenn $\hbar\omega = E_f - E_i$ erfüllt ist.

Zwischenzustand $|m\rangle$. Als Grundlage dient die Idee, dass die Übergangswahrscheinlichkeiten für die Übergänge vom Grundzustand in den virtuellen Zwischenzustand sowie vom Zwischenzustand in den angeregten Zustand, nicht verschwinden²

$$\langle m|\hat{H}_1|i\rangle \neq 0; \quad \langle f|\hat{H}_1|m\rangle \neq 0. \quad (2.34)$$

Analog zu Gleichung 2.25 erhält man für diesen virtuellen Zwischenzustand:

$$c_m(t) = -\frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle m|\hat{H}_1(t'')|i\rangle e^{i\omega_m t''} dt'' \quad (2.35)$$

Der angeregte Zustand $|f\rangle$ kann nur vom virtuellen Zustand $|m\rangle$ aus erreicht werden und kann analog zu Gleichung 2.22 ausgedrückt werden. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich das System vor diesem Übergang im virtuellen Zwischenzustand befindet, nicht gleich eins. Deshalb muss die Wahrscheinlichkeit für den Übergang vom Grundzustand in den virtuellen Zustand berücksichtigt werden.

$$\frac{\partial c_f(t)}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} c_m(t) \langle f|\hat{H}_1|m\rangle e^{-i\omega_f t} \quad (2.36)$$

$$c_f(t) = -\frac{i}{\hbar} \int_0^t c_m(t') \langle f|\hat{H}_1(t')|m\rangle e^{-i\omega_f t'} dt' \quad (2.37)$$

²Es gilt dabei die Bedingung, dass m weder gleich f noch gleich i ist

Einsetzen von 2.35 liefert somit:

$$c_{f_{2-photon}}(t) = -\frac{1}{\hbar^2} \int_0^t \langle f | \hat{H}_1(t') | m \rangle e^{-i\omega_f m t'} \cdot \int_0^{t'} \langle m | \hat{H}_1(t'') | i \rangle e^{i\omega_m i t''} dt'' \quad (2.38)$$

Die Übergangswahrscheinlichkeit vom Grundzustand $|i\rangle$ in den angeregten Zustand $|f\rangle$, basierend auf der zweiten Störungsordnung lautet schließlich:

$$\frac{|c_{f_{2-photon}}(t)|^2}{t} = \frac{1}{t} \left| -\frac{1}{\hbar^2} \int_0^t \langle f | \hat{H}_1(t') | m \rangle e^{-i\omega_f m t'} \cdot \int_0^{t'} \langle m | \hat{H}_1(t'') | i \rangle e^{i\omega_m i t''} dt'' \right|^2 \quad (2.39)$$

2.3 Ultrakurze Laserpulse

Die Erzeugung eines kurzen Laserpulses erfolgt durch die Überlagerung von ebenen Wellen mit unterschiedlicher Frequenz aber gleicher Phase. Ein kurzer Laserpuls an einem festen Ort lässt sich als Funktion der Zeit darstellen [Bar, 2002]:

$$E(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}(\omega) e^{i\omega t} d\omega = \frac{1}{2\pi} \int_0^{\infty} \tilde{E}(\omega) e^{i\omega t} d\omega + c.c. \quad (2.40)$$

$\tilde{E}(\omega)$ stellt das Spektrum des Pulses dar. $E(t)$ ist die Fouriertransformierte von $\tilde{E}(\omega)$. Sei ω_0 die Trägerfrequenz des Pulses und $\Delta\omega$ die Frequenzbreite des Pulses, dann kann die Gleichung 2.40 umgeschrieben werden zu

$$E(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\omega_0}^{\infty} \tilde{E}(\omega_0 + \Delta\omega) e^{i(\omega_0 + \Delta\omega)t} d\Delta\omega + c.c. \quad (2.41)$$

Durch Umformung kann der Ausdruck mittels der Einhüllenden $A(t)$ beschrieben werden

$$E(t) = e^{i\omega_0 t} \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{A}(\Delta\omega) e^{i(\Delta\omega)t} d\Delta\omega + c.c. = A(t) e^{i\omega_0 t} + c.c. \quad (2.42)$$

Unter Annahme eines gaußförmigen Zeitverlaufs des Pulses

$$A(t) = A_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^2} \quad (2.43)$$

ergibt sich

$$E(t) = A_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^2} e^{i(\Delta\omega)t} + c.c. \quad (2.44)$$

Die Einhüllende sowie das elektrische Feld eines solchen ultrakurzen Laserpulses sind in Abbildung 2.4 dargestellt.

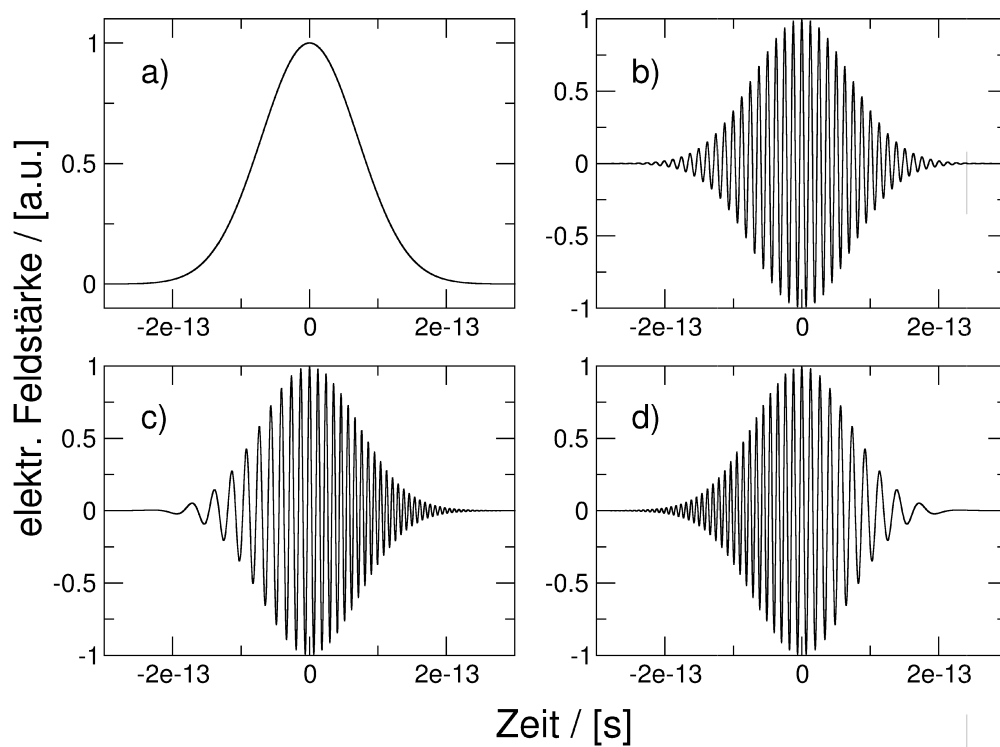


Abbildung 2.4: a) Einhüllende eines 100 fs langen Gauß-Pulses; b) elektrisches Feld eines 100 fs langen Gauß-Pulses; c) elektrisches Feld eines positiv chirpten Gauß-Pulses; d) elektrisches Feld eines negativ chirpten Gauß-Pulses

2.3.1 Pulsverbreiterung

Durchläuft ein kurzer Laserpuls ein dispersives Medium, haben die unterschiedlichen spektralen Anteile des Pulses verschiedene Gruppengeschwindigkeiten [Hei, 2002]. Beim Durchlaufen des Mediums werden die Frequenzanteile räumlich getrennt. In einem Medium mit positiver (negativer) Gruppengeschwindigkeitsdispersion eilen die roten, langwelligeren (blauen, kurzwelligeren) Anteile des Pulses den blauen (roten) voraus. Es wird von einem positiven (negativen) Chirp gesprochen. Der Chirp wird durch einen zusätzlichen Phasenterm ϕ ausgedrückt.

$$F(t) = A(t)e^{i\phi t^2} e^{i\omega t} + c.c. \quad (2.45)$$

Die Auswirkungen des Chirp-Parameters sind in Abbildung 2.4 in c) und d) in Form einer ansteigenden bzw. absteigenden Frequenz erkennbar.

2.3.2 Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Definitionen:

- Phasengeschwindigkeit: Ist die Geschwindigkeit, mit der sich Stellen konstanter Phase fortbewegen. Sie ist in optischen Medien wellenlängenabhängig.

$$v_p = \frac{\omega}{k}$$

- Gruppengeschwindigkeit: Ist die Geschwindigkeit, mit der sich die Einhüllende eines Wellenpaketes fortbewegt. Dabei kann sich jedoch die Form der Einhüllenden aufgrund von Dispersion (unterschiedliche Phasengeschwindigkeiten der einzelnen Frequenzkomponenten) verändern.

$$v_g = \frac{d\omega}{dk}$$

Wird die Phasenverschiebung $\phi(\omega)$ des elektrischen Feldes eines Laserpulses um die Zentralfrequenz ω_0 herum entwickelt, ergibt sich [Sil, 1984]:

$$\phi(\omega) = \phi(\omega_0) + \frac{d\phi}{d\omega}(\omega - \omega_0) + \frac{1}{2} \frac{d^2\phi}{d\omega^2}(\omega - \omega_0)^2 + \dots$$

ϕ und $d\phi/d\omega$ führen dabei lediglich zu einer Phasenverschiebung der Trägerfrequenz, also zu einer zeitlichen Verschiebung der Pulseinhüllenden. Der Term $\phi'' = \frac{d^2\phi}{d\omega^2}$ hingegen führt zu einer zeitlichen Verlängerung des Pulses, also einer Veränderung der Pulsform. Man nennt diesen Effekt Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD³). Bei normaler Gruppengeschwindigkeitsdispersion eilt der langwellige Anteil dem kurzwelligen voraus.

Die Berechnung der GVD basiert auf der Kenntnis der Phasenverschiebung. Sie beträgt für einen Laserpuls beim Durchlaufen eines transparenten Mediums der Länge L und dem frequenzabhängigen Brechungsindex $n(\omega)$ [Sau, 2007]

$$\phi(\omega) = -\frac{\omega L}{c} n(\omega).$$

³GVD - group velocity dispersion

Die Ableitungen lauten:

$$\phi'(\omega) = -\frac{L}{c} \left(n(\omega) + \omega \frac{dn(\omega)}{d\omega} \right) \quad (2.46)$$

$$\phi''(\omega) = -\frac{L}{c} \left(2 \frac{dn(\omega)}{d\omega} + \omega \frac{d^2n(\omega)}{d\omega^2} \right) \quad (2.47)$$

$$= \frac{L\lambda^3}{2\pi c^2} \frac{d^2n}{d\lambda^2} \quad (2.48)$$

Die dritte Ordnung der Dispersion wird durch die dritte Ableitung berechnet:

$$\phi''' = -\frac{L\lambda^4}{4\pi^2 c^3} \left(3 \frac{d^2n}{d\lambda^2} + \lambda \frac{d^3n}{d\lambda^3} \right)$$

Eine Abschätzung des Einflusses der Dispersion dritter Ordnung auf die Gruppengeschwindigkeitsdispersion ist [Conr, 1999]:

$$|\Delta\phi''(\omega)| \approx |\phi'''(\omega)\Delta\omega|$$

mit der spektralen Breite $\Delta\omega$ des Laserpulses:

$$\Delta\omega = 8\pi c \frac{\Delta\lambda}{4\lambda_0^2 - \Delta\lambda^2}$$

Die Pulsverlängerung kann wie folgt berechnet werden [Mes, 2008]:

$$\frac{\tau_{out}}{\tau_{in}} = \sqrt{1 + \left(\frac{l}{L_D} \right)^2} \quad (2.49)$$

Aus dieser Gleichung wird die Bedeutung der Dispersionslänge deutlich. Propagiert der Eingangspuls durch ein Medium mit einer Dicke gleich der Dispersionslänge $l = L_D$, verlängert sich der Puls gerade um den Faktor $\sqrt{2}$.

Die Dispersionslänge einer Quarzglasfaser beträgt mit $\phi''(\omega) = 35 \text{ fs}^2/\text{mm}$

$$L_D = \frac{1}{|\phi''(\omega)|} \left(\frac{\tau}{1,76} \right)^2 = 92,2 \text{ mm}. \quad (2.50)$$

Für die Pulslänge eines 100 fs langen Laserpulses, der durch eine 1m lange Quarzglasfaser propagiert, ergibt sich nach Gl.2.49 eine Pulslänge von $\tau_{out} = 1,09 \text{ ps}$. Die Ausgangspulslänge ist eine Größenordnung höher als die Eingangspulslänge.

2.3.3 Berechnung GVD in einer optischen Faser sowie deren Kompensation

Wird ein ultrakurzer Laserpuls mit einer typischen Länge von 100 fs in eine optische Faser eingekoppelt, tritt aufgrund der Materialdispersion innerhalb der Faser eine zeitliche Streckung des Pulses auf. Bei Faserlängen, die die Dispersionslänge von $L_D = 9$ cm (siehe Gl.2.50) deutlich überschreiten, ist die zeitliche Streckung sehr erheblich. Dies führt dazu, dass eine 2-Photonenabsorption nach dem Auskoppeln aus der Faser mit dem gestreckten Puls nicht mehr effizient möglich ist. Um die entstehende Dispersion zu kompensieren, muss diese zunächst berechnet werden um dann die Parameter für einen geeigneten Pulskompressor zu berechnen.

Im vorherigen Abschnitt wurde bereits die Gleichung für die Materialdispersion hergeleitet (2.48) Darin sind die Wellenlänge mit $\lambda = 800$ nm, die Lichtgeschwindigkeit c und die Länge der optischen Faser L bekannt. Noch nicht bekannt ist die zweite Ableitung des Brechungsindex. Es werden Quarzglasfasern für die weiteren Berechnungen angenommen.

Der wellenlängenabhängige Brechungsindex kann mit Hilfe der Sellmeier-Gleichung berechnet werden:

$$n(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{A\lambda^2}{\lambda^2 - B} + \frac{C\lambda^2}{\lambda^2 - D} + \frac{E\lambda^2}{\lambda^2 - F}}$$

Die Terme der ersten beiden Ableitungen sind sehr komplex und werden aus diesem Grund hier nicht aufgeführt.

Die Sellmeier Koeffizienten für Quarzglas sind aus [Conr, 1999] übernommen. Einsetzen dieser Koeffizienten sowie der Wellenlänge ergibt folgende Werte:

$$n = 1,453317245 \quad (2.51)$$

$$\frac{dn}{d\lambda} = -0,01728435104 \frac{1}{\mu m} \quad (2.52)$$

$$\frac{d^2n}{d\lambda^2} = 0,03988437415 \frac{1}{\mu m^2} \quad (2.53)$$

Da nun alle Größen bekannt sind, kann in 2.48 eingesetzt werden und die Berechnung liefert für eine 1 Meter lange Faser eine Dispersion von

$$\frac{d^2\phi_m}{d\omega^2} = \frac{L\lambda^3}{2\pi c^2} \frac{d^2n}{d\lambda^2} \approx 36.000 \text{ fs}^2 \quad (2.54)$$

Dieser Wert stimmt mit Angaben aus der Literatur [Gün, 2003] überein.

Um eine positive Gruppengeschwindigkeitsdispersion ausgleichen zu können, werden dispersive, optische Elemente wie Prismen oder Gitter verwendet. In einem Gitterkompressor wird das einfallende Licht zunächst von einem optischen Gitter spektral aufgespalten, reflektiert und trifft anschließend auf ein weiteres Gitter. Von diesem Gitter, welches parallel zum ersten Gitter angeordnet ist, propagiert das Licht bis zum einem Spiegel und wird entsprechend dem einfallenden Lichtstrahl zurück reflektiert (Abb. 2.5). Aufgrund der spektralen Aufspaltung der dispersiven Elemente, legt das kürzerwellige Licht einen kürzeren Lichtweg zurück als das langwelligere Licht. Diese Eigenschaft entspricht einer negativen Gruppengeschwindigkeitsdispersion. Somit kann mit einem solchen Kompressor die in der Faser entstehende positive Dispersion ausgeglichen werden. Die Dispersion eines Gitterkompressors hängt von den verwendeten Gittern bzw. der Gitterkonstanten, dem Abstand der Gitter sowie dem Einfallswinkel des Lasers ab.

Die zweite Ableitung der Phase für ein Gitterpaar ist [Fork, 1987]

$$\frac{d^2\phi}{d\omega^2} = \frac{\lambda^3 L_g}{\pi c^2 d^2} \left[1 - \left(\frac{\lambda}{d} - \sin \gamma \right)^2 \right]^{-3/2} \quad (2.55)$$

wobei d der Abstand der Rillen im Gitter, also die inverse Gitterkonstante ist. Der Winkel γ ist Abb. 2.5 zu entnehmen, er beschreibt den Einfallswinkel des Lasers zur Gitternormalen.

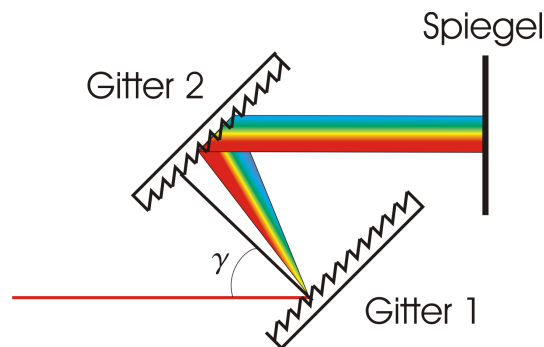


Abbildung 2.5: Ein Gitterkompressor spaltet das eintreffende Licht spektral auf, sodass verschiedene Wellenlängen unterschiedliche Wegstrecken im Pulskompressor zurücklegen. Der Endspiegel bewirkt ein abermaliges Durchlaufen der Gitter.

Der Winkel γ werde als $\gamma = \frac{\pi}{4} = 45^\circ$ und es werde ein Gitter mit 1200 Rillen/mm angenommen. Stellt man nun obige Gleichung nach dem Abstand der beiden Gitter L_g

um, so erhält man:

$$L_g = \left(\frac{d^2 \phi}{d\omega^2} \right) \frac{\pi c^2 d^2}{\lambda^3} \left[1 - \left(\frac{\lambda}{d} - \sin \gamma \right)^2 \right]^{3/2} \quad (2.56)$$

$$= 0,0125 \text{ m} = 1,25 \text{ cm} \quad (2.57)$$

Die Gitter kompensieren in einem Abstand von 1,25 cm somit die GVD, die eine optische Quarzglasfaser von einem Meter Länge erzeugt.

2.4 Mikroskopie

Das Mikroskop ist als wissenschaftliches Instrument vor allem in der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung zu einem unentbehrlichen Werkzeug geworden. Erfunden wurde das Instrument im 17. Jahrhundert durch den Niederländer Leeuwenhook [Wes, 2009]. Den anschließenden technischen Fortschritt in der Optik und somit einhergehenden Weiterentwicklungen des Mikroskops folgten auch biologisch-medizinische Erkenntnisse. Dem Physiker Ernst Abbe gelang es neben der Entwicklung seiner Theorie zur mikroskopischen Abbildung auch die Auflösung bis zu einer nach ihm benannte Grenze zu senken, der beugungsbedingten Abbildungsgrenze. Somit wurde u.a. die erstmalige Beobachtung des Verhaltens der Chromosomen während der Zellteilung möglich.

Heutzutage ist die Fluoreszenzmikroskopie die am weitesten verbreitete Art der Mikroskopie in der biologisch-medizinischen Forschung [Paw, 2006]. Durch spezifische Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff können Informationen über Lage und Funktion von bestimmten Zellbausteinen gewonnen werden. Jedoch unterliegt auch diese Technik der von Abbe beschriebenen Grenze der Auflösung. Sie besagt, dass das Auflösungsvermögen durch die Ausdehnung des Beugungsmusters des Lichts an der Öffnung des Objektivs bestimmt ist. Um zwei benachbarte Objekte noch voneinander trennen zu können, müssen sie so weit auseinander liegen, dass sich die Hauptmaxima ihrer Beugungsmuster nicht überlappen. Die Abbesche Auflösungsgrenze in einer Formel ausgedrückt lautet

$$\Delta r = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.58)$$

wobei n der Brechungsindex, λ die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs sind. NA ist die numerische Apertur des Objektivs, die Definition geht aus obiger Formel hervor. Werden übliche Werte mit einer Wellenlänge $\lambda = 550 \text{ nm}$ und $NA = 1,3$ angenommen, so ergibt sich eine Auflösungsgrenze von

$\Delta r \approx 260$ nm. Liegen die Objekte näher als 260 nm beieinander, so können sie nicht mehr voneinander getrennt werden. Diese beugungsbedingte Begrenzung kann heutzutage zwar durch Rastersondenmikroskope und Nahfeldmikroskope überwunden werden, sind aber nicht uneingeschränkt für die Anwendung in der biologischen Forschung anwendbar. Das noch recht neue STED-Verfahren war die erste Fernfeldmikroskopiemethode, die die Beugungsgrenze unterschreiten konnte [Hell, 1994].

2.4.1 Fluoreszenzrastermikroskopie

Neben der Möglichkeit die gesamte Probe einheitlich zu beleuchten, kann sie durch einen oder mehrere Laserstrahlen Punkt für Punkt abgerastert werden. Die seriell gespeicherten Intensitätswerte des detektierten Fluoreszenzlichts können anschließend in einem Bild dargestellt werden. In der biologischen Mikroskopie haben sich das konfokale (CLSM) und das Multiphotonenrastermikroskop (TPSLM) durchgesetzt.

Konfokale Rasterfluoreszenzmikroskopie

Bei der konfokalen Rastermikroskopie wird die Probe durch einen Laserstrahl abgerastert. Das Laserlicht wird zunächst durch eine Lochblende geleitet und wirkt somit wie eine punktförmige Lichtquelle. Die von dieser punktförmigen Lichtquelle ausgehende Wellenfront wird vom Objektiv gesammelt und gemäß der geometrischen Optik auf den geometrischen Bildpunkt fokussiert. Dieser Bildpunkt hat aufgrund der Beugung jedoch eine dreidimensionale Intensitätsverteilung, mit dem geometrischen Fokus als Zentrum. Die Intensitätsverteilung lässt sich in guter Näherung beschreiben mit [Hel, 2005]

$$I(u, v) = C \cdot h(u, v) = C' \left| \int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \exp\left(\frac{1}{2}iu\rho^2\right) \rho d\rho \right|^2 \quad (2.59)$$

$J_0(v\rho)$ ist die Bessel-Funktion 0. Ordnung, $P(\rho)$ ist die Pupillen-Funktion, welche die Ausleuchtung des Objektivs beschreibt. Für eine gleichförmige Ausleuchtung ist $P(\rho) = 1$, für eine Gauß-förmige Ausleuchtung $P(\rho) = \exp(-\rho^2/T^2)$ wobei sich der Füllfaktor T aus den Durchmessern des Laserstrahls B_{beam} und dem Durchmesser der Rückapertur des Objektivs B_{BA} zusammensetzt $T = B_{beam}/B_{BA}$. Die Koordinaten u, v sind mit den Ortskoordinaten x, y und z ($r = \sqrt{x^2 + y^2}$) wie folgt verknüpft:

$$u = \frac{8\pi n z \sin^2(\alpha/2)}{\lambda} \quad (2.60)$$

$$v = \frac{2\pi n r \sin(\alpha)}{\lambda} \quad (2.61)$$

In Gl. 2.59 ist die Funktion $h(u, v)$ die sogenannte Beleuchtungsabbildungsfunktion oder auch point-spread-function (PSF). Die Konstante C normiert diese Funktion zu Eins. Eine dreidimensionale Darstellung der Funktion $h(u, v)$ ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Die Intensitätsverteilung im Fokus hängt auch von der Beleuchtung des abbildenden Objektivs ab [Hel, 2005]. Bei der Verwendung eines Lasers ist das Beleuchtungsprofil des Objektivs normalerweise gaußförmig. Somit werden die achsenfernen Regionen des Objektivs schwächer ausgeleuchtet und die Abbildungsfunktion wird insgesamt etwas unschärfer und größer. Dieser Effekt wird vor allem in Abbildung 2.8 durch die logarithmische Skalierung der Intensität deutlich. Praktisch ist also eine möglichst vollständige Ausleuchtung des Objektivs anzustreben.

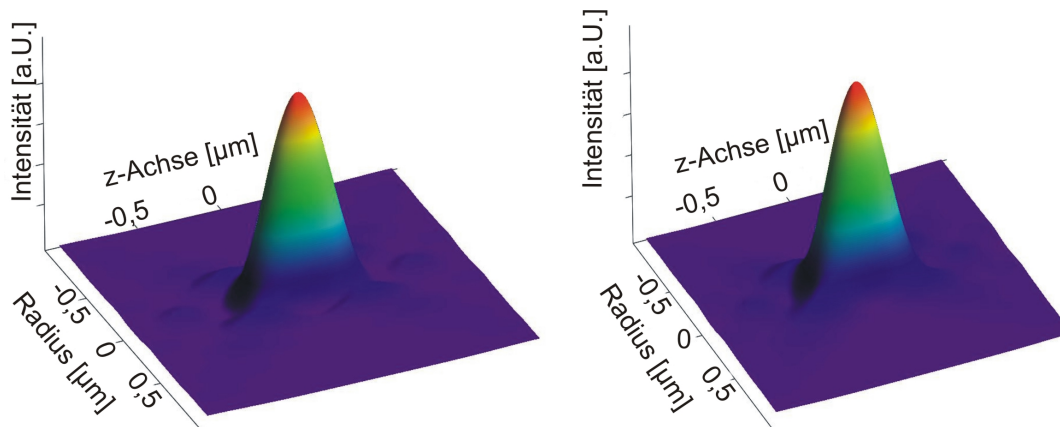


Abbildung 2.6: linkes Diagramm: PSF eines Wasserimmersionsobjektivs mit einer numerischen Apertur von 1,35 und einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm; rechtes Diagramm: PSF mit einer Gauß-förmigen Ausleuchtung des Objektivs

Das laterale Auflösungsvermögen lässt sich berechnen, indem die PSF für $z = 0$, bzw. ausgedrückt in den neuen Ortskoordinaten, $u = 0$ berechnet wird. Das Ergebnis ist die sogenannte Airy-Funktion, dessen Hauptmaximum ein Maß für die Auflösung in der Fokalebene darstellt. Das Hauptmaximum wird auch Airy-Scheibe genannt.

Die dreidimensionale Intensitätsverteilung im Fokus kann als Wahrscheinlichkeit betrachtet werden, dass ein Anregungsphoton sich an einem Punkt (u, v) befindet und dort ein Fluoreszenzphoton erzeugt. Dieses vom Fluorophor emittierte Photon muss detektiert werden um einen Beitrag zum Messsignal leisten zu können. Dazu muss es die zur Eingangsblende optisch konjugiert angeordnete Lochblende vor dem Detektor passieren. Dieser Detektionsprozess kann aufgrund des konjugierten Aufbaus ebenfalls als PSF

aufgefasst werden. Den einzigen Unterschied zur Anregungs-PSF stellt die leicht verschobene Emissionswellenlänge dar. Die effektive Abbildungsfunktion eines konfokalen Mikroskops lautet somit:

$$h_{conf}(u, v) = h_{ill}(u, v) \cdot h_{det}(u, v) \quad (2.62)$$

Diese Funktion ist im Vergleich zur Beleuchtung-PSF deutlich schmaler und besitzt keine Nebenmaxima mehr. Dies ist damit zu begründen, dass es aufgrund der Detektions-PSF wahrscheinlicher ist, ein Photon aus der unmittelbaren Umgebung des Fokus zu detektieren als ein weit davon entferntes. Weiter entfernte Fluoreszenzphotonen werden durch das Pinhole vor dem Detektor geblockt bzw. ausgeblendet. Dies ist anschaulich in Abbildung 2.7 erkennbar.

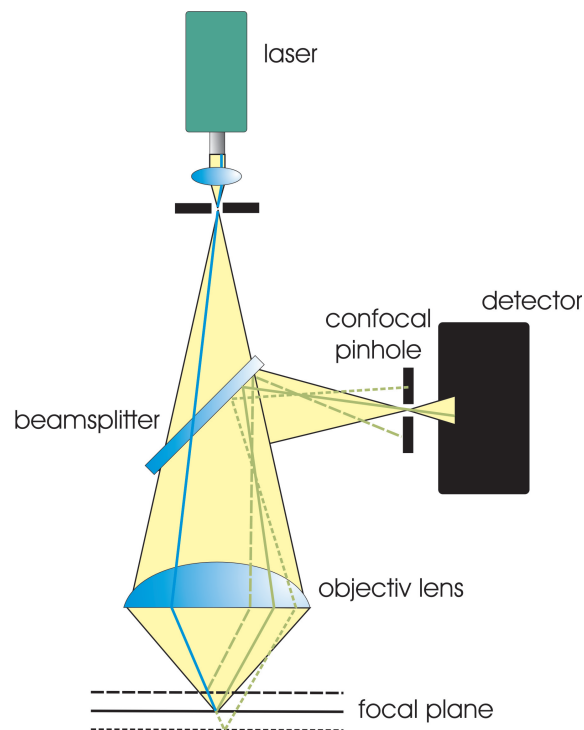


Abbildung 2.7: Anregungslicht wird durch ein Mikroskopobjektiv in die Probe fokussiert. Das entstehende Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene passiert ein Pinhole und wird vom anschließenden Detektor erfasst.

Gleichung 2.62 wurde zur Berechnung der entsprechenden Funktionen in Abbildung 2.8 verwendet. Das Fluoreszenzbild $b(u, v)$ ergibt sich aus der Faltung der effektiven PSF

$H_{conf}(u, v)$ und der räumlichen Verteilung der Fluoreszenzmoleküle $t(u, v)$. Die Faltung wird technisch durch das dreidimensionale Abrastern der Probe bewerkstelligt.

Nicht jedes eingestrahlte Photon wird von einem Fluoreszenzmolekül absorbiert. Die Rate, mit der ein Molekül aus dem Grundzustand heraus angeregt ist, ist gegeben durch

$$k_1 = \frac{\sigma_1 I}{\hbar \omega} \quad (2.63)$$

σ_1 ist der Wirkungsquerschnitt der Einphotonenabsorption. Diese Gleichung hat jedoch nur solange Gültigkeit, bis Sättigung eintritt. Nach der Anregung bestimmt die Lebenszeit τ des angeregten Moleküls die Zeit, bis das Molekül erneut wieder angeregt werden kann. Sind zu viele Moleküle im angeregten Zustand, können die eingestrahelten Photonen keine Moleküle mehr aus dem Grundzustand heraus anregen und der Farbstoff befindet sich in Sättigung. Der Wirkungsquerschnitt der Einphotonenabsorption des gebräuchlichen Farbstoffs DAPI liegt für eine Anregungswellenlänge von 345 nm bei $1,3 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ [Xu, 1996].

Multiphotonenrastermikroskopie

Ihren Anfang erfuhr die Multiphotonenrastermikroskopie mit einer Arbeit von Maria Meier-Göppert, in der sie 1931 die simultane Absorption zweier Photonen in einem Atom bzw. Molekül erklärte [Göp, 1931]. Es dauerte jedoch noch bis zum Jahr 1960, bis die erste experimentelle 2-Photonen Anregung in $CaF_2 : Eu^{2+}$ realisiert werden konnte [Kai, 1960]. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde die 2-Photonen-Absorption erstmals im Jahre 1990 angewendet [Denk, 1990].

Die PSF bei der 2-Photonenmikroskopie lautet:

$$h_{2-phot} = h_{ill}^2 \left(\frac{u}{2}, \frac{v}{2} \right) \quad (2.64)$$

Die halbierten optischen Koordinaten sind der Tatsache geschuldet, dass für die Absorption Photonen mit der doppelten Wellenlänge eingestrahlt werden müssen um ein Elektron in den angeregten Zustand zu bringen. Für jedes einzelne eingestrahlte Photon gilt die bereits bekannte Funktion h_{ill} . Da nun zwei Photonen gleichzeitig am selben Ort zur Absorption beitragen müssen, ist die Wahrscheinlichkeit proportional zum Produkt $h_{ill} \cdot h_{ill}$. Somit ist auch der Effekt des Pinholes (das Quadrieren) bereits erreicht, um eine dreidimensionale Auflösung zu ermöglichen. In der 2-Photonen-Mikroskopie wird, im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie, kein Pinhole vor dem Detektor verwendet.

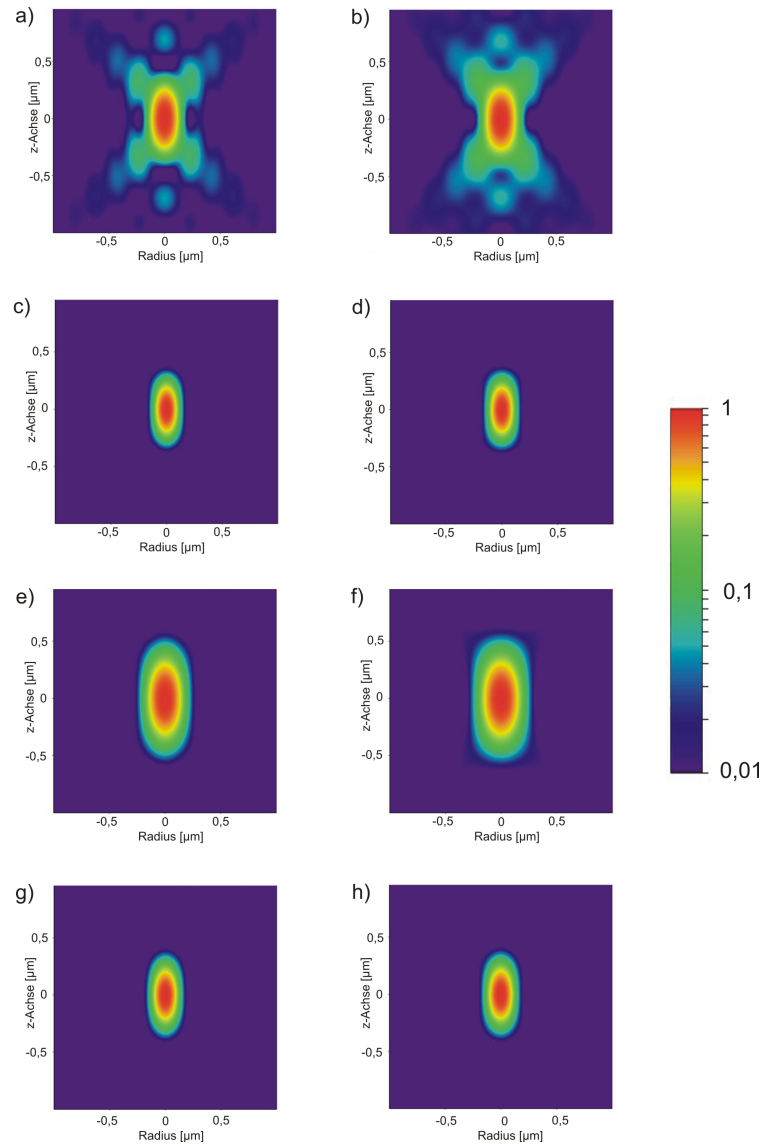


Abbildung 2.8: Normierte PSF für ein Wasserimmersionsobjektiv mit $NA=1,35$ in einem Schnitt entlang der optischen Achse: a) Intensitätsverteilung im Fokus h_{ill} bei $\lambda = 488$ nm; b) wie a) mit Gauß-förmiger Beleuchtung; c) effektive konfokale PSF $h_{ill}h_{det}$ mit $\lambda_{det} = 530$ nm, d) wie c) mit Gauß-förmiger Beleuchtung; e) PSF des 2-Photonenmikroskops h_{ill}^2 bei $\lambda = 800$ nm; f) wie e) mit Gauß-förmiger Beleuchtung; g) effektive PSF des 2-Photonenmikroskops $h_{ill}^2 h_{det}$ mit $\lambda_{det} = 530$; h) wie g) mit Gauß-förmiger Beleuchtung.



Abbildung 2.9: Bei der CLSM (links) wird sowohl in der Fokusebene als auch außerhalb der Fokusebene Fluoreszenz erzeugt, bei der TPLSM (rechts) wird lediglich in der Fokusebene Fluoreszenz erzeugt

Die Verwendung von Photonen mit der doppelten Anregungswellenlänge⁴ bringt für die Verwendung in streuendem Gewebe einen weiteren Vorteil mit sich. Licht mit einer größeren Wellenlänge wird weniger stark gestreut. Bei Streukörpern, die deutlich kleiner als die Wellenlänge sind, tritt die Rayleigh-Streuung auf, die proportional zu λ^{-4} ist. Bei Streukörpern im Bereich der Wellenlänge tritt die Mie-Streuung auf, die im Gegensatz zur isotropen Rayleigh-Streuung eher vorwärts gerichtet ist [Roe, 2000]. Die Streuung des Fluoreszenzlichts wirkt sich bei der 2-Photonen-Mikroskopie nicht so stark intensitätsmindernd aus, da auch diese Photonen detektiert können und zum Detektionssignal beitragen. Im Gegensatz dazu werden in der konfokalen Mikroskopie nur die ballistischen Photonen⁵ registriert, die gestreuten Fluoreszenzphotonen werden ebenso wie die fokussierten erzeugten Photonen vom Pinhole geblockt. Da ein Fluoreszenzmolekül nur ca. 5 000- bis 10 000-mal angeregt werden kann bevor es irreversible Zerstörungsprozesse erleidet [Hell, 2005], ist die 2-Photonen Absorption schonender für das Gewebe und vermindert den Bleaching-Effekt. Dieser ist bei der konfokalen Mikroskopie erhöht, da hier außerhalb des Anregungsvolumens Fluoreszenzphotonen erzeugt werden, die ohne Beitrag zum Signal vom Pinhole geblockt werden.

Analog zur Einphotonenabsorption soll auch für den 2-Photonen Prozess die Absorptionsrate angegeben werden. Sie lautet

$$k_2 = \frac{\sigma_2 I^2}{(\hbar\omega)^2} \quad (2.65)$$

wobei σ_2 den 2-Photonenwirkungsquerschnitt angibt. Im Gegensatz zu 2.63 ist die Rate proportional zum Quadrat der Intensität. Die Auswirkung der Wahrscheinlichkeit

⁴typischerweise nah-infrarotes Licht (NIR)

⁵ballistische Photonen sind Photonen, die keinem Streuprozess unterworfen wurden

der 2-Photonenabsorption im Zusammenspiel mit der quadratischen Intensitätsabhängigkeit lässt sich sehr anschaulich in einem Zahlenbeispiel darstellen. Ein exzellentes ein- und zwei-Photonen Absorbermolekül wie z.B. Rhodamin B absorbiert in hellem Sonnenlicht 1 Photon pro Sekunde durch 1-Photonen Absorption, jedoch nur alle 10 Millionen Jahre eines durch 2-Photonen Absorption [Denk, 1997]. Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit der Absorptionsrate von der eingestrahlten Intensität wird die Multiphotonenabsorption häufig als nichtlineare Absorption bezeichnet. Der Wirkungsquerschnitt der 2-Photonenabsorption liegt für den bereits bei der Einphotonenabsorption erwähnten Farbstoff DAPI bei $0,16 \cdot 10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}/\text{Photon}$. Der Wirkungsquerschnitt der hier nicht detailliert behandelten 3-Photonenabsorption liegt für diesen Farbstoff bei $0,25 \cdot 10^{-83} \text{ cm}^6(\text{s}/\text{Photon})^2$ [Xu, 1996].

2.5 Fluoreszenz-Lebenszeit Imaging (FLIM)

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, ist die Fluoreszenzlebenszeit die Zeit, in der eine Population, bestehend aus N elektronisch angeregten Molekülen, bis auf den 1/e-ten Anteil abgeregt wurde. Die auftretenden Abregungsprozesse sind Fluoreszenz, Phosphoreszenz, intersystem crossing, innere Umwandlung und Abgabe der Energie in Vibrationszustände⁶. Jeder dieser Prozesse besitzt eine spezifische Wahrscheinlichkeit und eine unterschiedliche Lebenszeit. Die Lebenszeiten erstrecken sich über mehrere Größenordnungen, so geschieht der Prozess der inneren Umwandlung innerhalb von mehreren Femtosekunden, die Lebenszeit der Phosphoreszenz kann hingegen einige Sekunden betragen [McGo, 2000].

Es gibt zwei technische Lösungen um die Fluoreszenzlebenszeit von Molekülen messen zu können, die Datenerfassung in der Zeit-Domäne und in der Frequenz-Domäne. Obwohl beide Methoden auf ganz unterschiedlichen technischen Grundlagen basieren, lassen sich die Ergebnisse durch eine Fouriertransformation ineinander überführen.

Für die Datenerfassung in der Frequenz-Domäne wird hochfrequentes, sinusförmig moduliertes Anregungslicht verwendet. Das bei dieser Methode detektierte Licht besitzt die gleiche Modulationsfrequenz wie das Anregungslicht, erfährt jedoch in Abhängigkeit der Lebensdauer der Moleküle einen Phasenversatz φ und eine relative Amplitudenänderung zum Anregungslicht. Aus beiden Parametern lässt sich jeweils ein Wert für die Lebens-

⁶die innere Umwandlung und die Abregung in Vibrationsniveaus sind strahlungslose Übergänge

zeit berechnen, τ_p und τ_M . Im Idealfall eines Emitters sind beide Lebenszeiten identisch $\tau = \tau_p = \tau_M$. Unterschiedliche Werte für die Lebenszeiten lassen auf ein Gemisch aus mehreren, unterschiedlichen Emittlern schließen [Ber, 2010].

Bei der Zeit-Domänen Methode wird die Probe mit kurzen Lichtpulsen, vorzugsweise mit kurzen Laserpulsen, angeregt. Nachdem zunächst viele Methoden zur Lebenszeitmessung in der Zeit-Domäne entwickelt wurden, war es das Verfahren des *time-correlated single photon counting* (TCSPC), welches die Messung sehr erleichterte und somit quantitative Photonenzählungen ermöglichte.

In der Fluoreszenzmikroskopie verwendete Fluorophore haben eine typische Abklingzeit bzw. Lebensdauer im Pikosekundenbereich. Eine Zeitmessung zu realisieren, die diese exponentielle Abklingfunktion hinreichend genau abtasten könnte, müsste im Sub-Pikosekundenbereich liegen. Diese Zeitskala ist für heutige Elektroniken nicht erreichbar. Das TCSPC Verfahren basiert deshalb auf der Detektion einzelner Photonen eines periodischen Lichtsignals, der Messung von Detektionszeiten und der Rekonstruktion der Abklingkurve anhand individueller Zeitmessungen [Bec, 2008a], [Bec, 2005], [Con, 1984].

Die Anregungsquelle ist typischerweise ein gepulster Laser mit einer hohen Repetitionsrate von 80 MHz, die Pulse besitzen einen zeitlichen Abstand von 12,5 ns. Die Zeitspanne von einem Puls bis zu dem nachfolgenden Puls wird als eine Periode bezeichnet. Anstatt in jeder Periode eine Abklingkurve zu messen, besteht das gemessene Signal bei der TCSPC-Methode aus wenigen, zufällig verteilten Peaks auf der Zeitachse (s. Abb. 2.10). Die Pulse repräsentieren die Detektion einzelner Photonen. Weiterhin ist zu erkennen, dass in vielen Perioden kein Photon detektiert wurde, in anderen wurde ein Photon detektiert. Für ein detektiertes Photon wird die Ankunftszeit in Relation zum Anregungspuls gemessen. Diese Zeit wird anschließend in einem Histogramm gespeichert (Abb. 2.10). Mit jedem detektierten und gemessenen Photon wird das Histogramm weiter aufgefüllt und die Photonverteilung über die Zeit in einer Periode wird aufgebaut. Es entsteht somit die Abklingkurve des Fluorophors. Durch das Anfitzen einer Exponentialfunktion an diese Abklingkurve kann schließlich die Fluoreszenzlebenszeit bestimmt werden. Für das Anfitzen wird die Exponentialfunktion für die Abklingzeit der elektronisch angeregten Zustände bzw. der Fluoreszenzintensität verwendet

$$I(t) = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right). \quad (2.66)$$

Die Zeitauflösung einer analogen Aufnahmetechnik ist abhängig vom Signal bei der Detektion eines Elektrons (*single electron response* - SER). Die zeitliche Ausdehnung die-

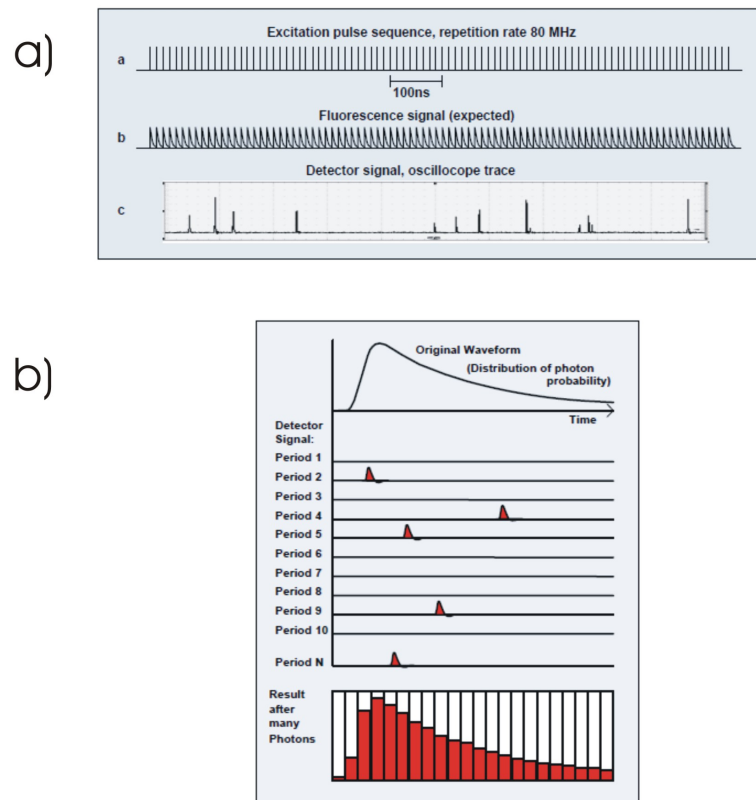


Abbildung 2.10: a) Anregungspulse mit fester Repetitionsrate führen zu unregelmäßigen Detektionssignalen b) Detektierte Signale werden in einem Histogramm gespeichert aus dem ein exponentielles Abklingverhalten berechnet wird [Bec, 2008a]

ses Signals bestimmt die minimale Zeitauflösung eines solchen Detektors. Die TCSPC-Technologie ist nicht abhängig von der SER. Die Zeitauflösung für diese Methode ist ausschließlich von der Genauigkeit der Zeitmessung eines registrierten Photons abhängig, angegeben durch die *transit time spread* (TTS). Die TTS ist typischerweise eine Größenordnung niedriger als die SER, was zu einer Verbesserung der Zeitauflösung des TCSPC gegenüber einer analogen Aufnahmetechnik mit dem gleichen Detektor um den Faktor 10 bedeutet. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Responsefunktion des Detektors nicht die minimal auflösbare Fluoreszenzlebenszeit angibt, da diese erst aus dem Anfitzen an die Abklingfunktion bestimmt wird und somit deutlich kürzer sein kann als die Responsefunktion.

Um die Zeitauflösung der verwendeten Detektoren bestimmen zu können, wird die sogenannte *instrument response function* (IRF) vermessen [Bec, 2008b], [Luc, 2009]. Die IRF ist diejenige Pulsform, die ein FLIM System aufnimmt, wenn eine infinitesimal kurze Fluoreszenzlebenszeit gemessen wird. Aufgrund des dichroitischen Beamsplitters im Aufbau eines 2-Photonen-Mikroskops, kann kein Reflexionssignal für diese Messung verwendet werden. Das Reflexionssignal wird durch den Beamsplitter geblockt und gelangt nicht zum Detektor. Darüber hinaus sind viele Detektoren im Wellenlängenbereich von 700-1000 nm, in dem der Anregungslaser bei der TPLSM arbeitet, nicht mehr sensitiv. Aus diesem Grund muss eine Probe mit einer extrem kurzen Fluoreszenzlebenszeit verwendet werden. Die beste Möglichkeit, die Wellenlänge in einer infinitesimal kurzen Zeit in den VIS-Bereich zu konvertieren, ist die Erzeugung der Zweiten Harmonischen (SHG). Die SHG ist ein ultraschneller, nichtlinearer Prozess der exakt die halbe Wellenlänge des Anregungslichts erzeugt. SHG tritt in Materialien mit einer hohen Ordnung auf molekularer Ebene auf. Typische Proben sind Kollagenfasern und einige Kristalle. Für die durchgeführte Messung (Abb. 2.11) der IRF wurden die Kollagenfasern von humanem Knorpelgewebe verwendet. Es wurden zwei zur Verfügung stehende Detektoren miteinander verglichen. Es sollte ermittelt werden, welcher Detektor die kürzere IRF besitzt und somit besser für die Verwendung mit dem TCSPC-System geeignet ist. Aufgrund der dargestellten IRF der beiden Detektoren konnte der Detektor Hamamatsu H5783 als der Detektor mit der kürzeren IRF ermittelt werden.

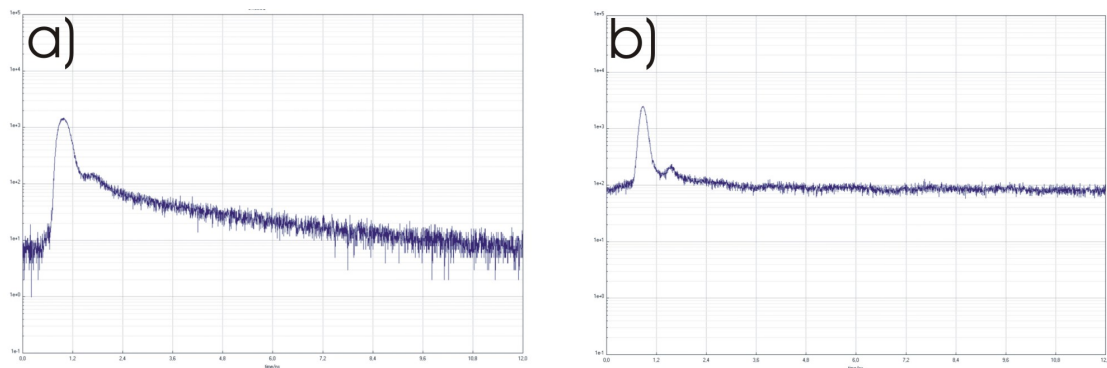


Abbildung 2.11: Die IRF des Detektors Hamamatsu H7422 (a) ist mit $\text{FWHM}=320$ ps ca. doppelt so lang wie die IRF des Detektors Hamamatsu H5783 (b) mit $\text{FWHM}=188$ ps

Die Zählrate der Fluoreszenzphotonen muss im Bereich von 0,01 bis 0,1 Photonen pro Periode betragen, sodass in jeder 10ten bis 100sten Periode ein Photon detektiert wird.

Bei höheren Zählraten steigt die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Photonen in einer Periode auftreten. Die zur Detektion verwendeten Photomultiplier (PMT) haben nach der Detektion eines Photons eine Totzeit von einigen Nanosekunden. Treffen zwei Photonen innerhalb einer Periode auf, so wird das erste Photon registriert, das zweite Photon kann jedoch aufgrund der Totzeit nicht zum Signal bzw. zum Histogramm beitragen. Wiederholt sich dieser Vorgang, wird sich die Abklingzeit zu kürzeren Zeiten hin verschieben, da einige Photonen mit längeren Ankunftszeiten nicht detektiert werden. Dieser Effekt wird „Pile-up“ genannt.

Wie die Zeitmessung mit dem Referenzpuls gestartet, führt dies aufgrund der geringen Fluoreszenzphotonendichte zu vielen „leeren“ Messungen. Aus diesem Grund wurde die *reverse start-stop* Methode entwickelt. Bei dieser Methode wird die Messung anstatt mit dem Referenzsignal mit der Detektion eines Fluoreszenzphotons gestartet. Nach der Detektion wird die Zeit bis zum nächsten Referenzsignal gemessen. Aus der Periodizität der Referenzpulse kann die Zeit zwischen Fluoreszenzphoton und seinem vorausgegangenem Referenzpuls geschlossen werden.

2.6 Mikroendoskopie

Die (nichtlineare) optische Mikroskopie hat sich in der biologischen und medizinischen Forschung, vor allem in der Neurowissenschaft sowie in der Krebsforschung durchgesetzt. Jedoch kann diese Technik nur sehr begrenzt in der *in vivo* Bildgebung eingesetzt werden. In der *in vivo* Bildgebung ist das Endoskop als minimal invasiver Eingriff nicht mehr aus dem Alltag in der Medizin wegzudenken. Eine Kombination aus (nichtlinearer) Mikroskopie und Endoskopie in Form eines nichtlinearen Mikroendoskops vereint die Vorteile beider Techniken und eröffnet ein breites Anwendungsspektrum. Mikroendoskopische Systeme werden für die Bildgebung im Gehirn von Säugetieren [Jun, 2004], die Bildgebung innerer Organe [Fu, 2006], [Bao, 2008] sowie dermatologische Untersuchungen [Köh, 2007] verwendet.

2.6.1 Sensitivität

Die Sensitivität ist ein kritischer Parameter von faseroptischen, mikroendoskopischen Systemen. Das grundlegende Problem besteht in der effizienten Übertragung des Anregungslasers sowie der Zurückführung des Fluoreszenzsignals. Hier sind vor allem die Ein-

koppeleffizienzen des Anregungslasers in die Faser sowie des Fluoreszenzsignals entscheidend. Aufgrund von spektralen und zeitlichen Verbreiterungen ultrakurzer Laserpulse in optischen Fasern sinkt die Anregungseffizienz im Fokus. Die begrenzte numerische Apertur von Objektiven, die für die Mikroendoskopie eingesetzt werden können, sowie deren kleiner Durchmesser verringert die Detektionseffizienz des erzeugten Fluoreszenzlichts.

2.6.2 Scaneinheiten

Für die Erstellung von mikroskopischen Fluoreszenzbildern ist eine Rasterung der Probe mit dem Anregungslicht notwendig. Eine erste mögliche Realisierung ist die Verwendung zweier galvanischer Scanspiegel in Kombination mit einem optischen Faserbündel. Dieser Aufbau ermöglicht eine starre, ultra-kompakte Bauweise. Die Scanspiegel sind vor dem Faserbündel angebracht und rastern das proximale Ende des Faserbündels im Fokus eines Mikroskopobjektivs ab [Car, 2005], [Lia, 2002], [Rou, 2000], [Göb, 2004]. Das Eingabemuster auf dem einen Ende des Faserbündels entspricht dem Ausgabemuster auf der anderen Seite der Faserbündels. Bei einer weiteren technischen Realisierung wird kein Faserbündel verwendet, sondern eine einzelne Lichtleitfaser. Bei diesem Ansatz muss entweder die distale Faserspitze bewegt werden oder das Laserlicht wird mittels eines Mikrospiegels am distalen Ende der Faser abgelenkt, um die Rasterung durchzuführen. Die Ablenkung der Faserspitze wird zumeist mit piezoelektrischen oder elektromagnetischen Aktuatoren realisiert [Hel, 2001], [Flu, 2005b], [Sei, 2002]. Mikrospiegel können aufgrund der Entwicklung von MEMS (microfabricated micromechanical systems) in immer kleineren Dimensionen hergestellt werden [Dic, 1996], [Hof, 1999], [Piy, 2000]. Der Vorteil bei der Verwendung einer einzelnen Faser besteht in einer deutlich größeren Lichteffizienz, da der Anregungslaser in eine einzelne starre Faser deutlich effizienter eingekoppelt werden kann als es bei einer Rasterung eines Faserbündelendes möglich ist. Die Miniaturisierung des Scanmechanismus am Faserende begrenzt jedoch die mechanische Robustheit des Systems sowie deren Dimensionierung. Die verschiedenen Scaneinheiten sind in Abbildung 2.12 dargestellt.

2.6.3 Endoskopische Objektivlinsen

Mikroskopobjektive besitzen einen Durchmesser von ca. 2-3 cm. Diese Ausmaße sind für die Mikroendoskopie deutlich zu groß. Miniaturisierte Mikroskopobjektive im Submilli-

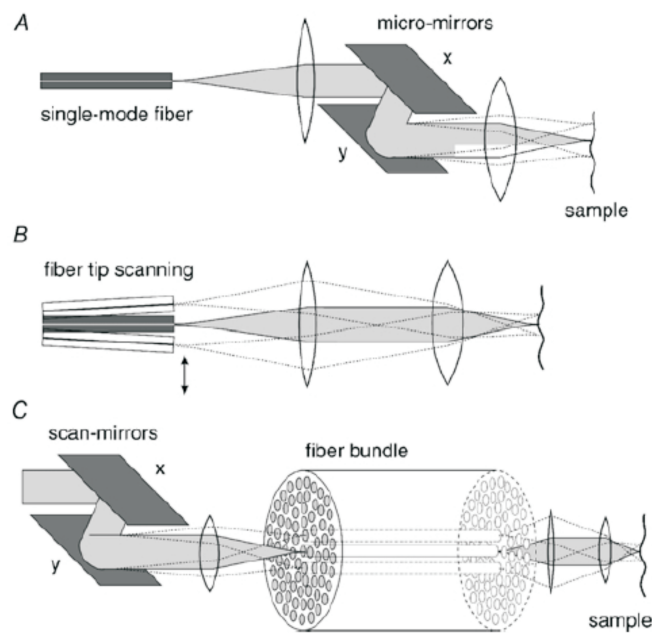


Abbildung 2.12: Scaneinheiten in der Mikroendoskopie: a) Mikrospiegel zwischen Faser und Objektiv; b) (Piezoelektrisch) ausgelenkte Faserspitze; c) Scanspiegel vor einem Faserbündel (aus [Hel, 2005])

meterbereich bestehen zumeist aus GRIN⁷-Linsen.

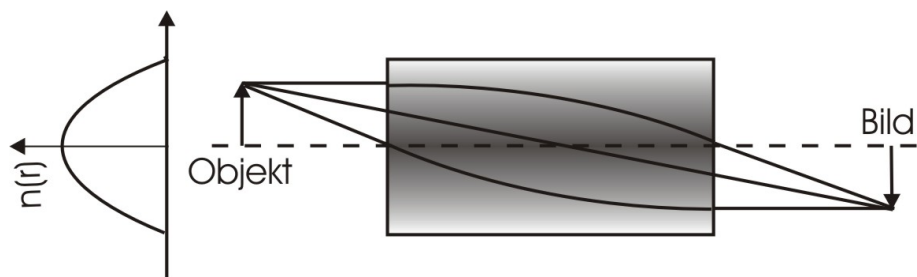


Abbildung 2.13: Strahlengang in einer GRIN-Linse nach [Mes, 2003]. Auf der linken Seite ist der Verlauf des Brechungsindex entlang des Radius dargestellt.

Konventionelle Sammellinsen manipulieren die Ausbreitungsrichtung von Licht durch

⁷GRIN - Gradienten Index

den abrupten Brechzahlunterschied zwischen der Oberfläche des Linsenmaterials und der umgebenden Luft. Aufgrund der speziellen Oberflächenstruktur der Linse können die einfallenden Lichtstrahlen gebündelt und somit ein Gegenstand abgebildet werden. Die Oberflächenqualität der Linse bestimmt die optische Präzision und ist somit der limitierende Faktor bei der Miniaturisierung einer Linse [Mes, 2005]. GRIN-Linsen nutzen eine andere Methode um diese Eigenschaften umzusetzen. Die Linsenwirkung einer GRIN-Linse wird durch eine kontinuierliche Änderung des Brechungsindex hervorgerufen [Iga, 1980]. Bei ihr fällt der Brechungsindex, der im Zentrum maximal ist, zum Rand hin nahezu parabolisch ab (s. Abbildung 2.13). Entscheidend für die optischen Eigenschaften der GRIN-Linse ist die Brechzahlprofilform und der Brechzahlunterschied zwischen Zentrum n_0 und Linsenrand n_r . Dieser Brechzahlunterschied bestimmt die numerische Apertur der Linse

$$NA = \sqrt{n_0^2 - n_r^2}. \quad (2.67)$$

Die Herstellung erfolgt durch Ionenaustauschprozesse in Spezialglas [Mes, 2003]. Ein großer Vorteil gegenüber konventionellen Linsen ist die Ablenkung des Lichtstrahls im Innern der Linse. Dies ermöglicht es, eine Linse mit planaren Grenzflächen herzustellen. Die Qualität der Abbildung ist nicht abhängig in der Präzision bei der Herstellung der Grenzflächen, was wesentliche Vorteile bei der Miniaturisierung dieser Linsen mit sich bringt. Der Durchmesser dieser Linsen kann bis auf 0,2 mm reduziert werden. Sie sind somit hervorragend für den Einsatz in der Mikroendoskopie geeignet.

Im Innern der Linse entsteht ein kosinusförmiger Strahlverlauf in Achsrichtung dessen Periode bzw. Pitchlänge P weder vom Eintrittsort noch vom Eintrittswinkel abhängt. Die Pitchlänge ist entscheidend für die optischen Abbildungseigenschaften einer GRIN-Linse [Grin, 2010].

- Eine 1/4-Pitch-Linse bildet eine Punktquelle in der Eintrittsfläche der Linse in das Unendliche ab bzw. sie kollimiert diese. Das Haupteinsatzgebiet dieser Linsen ist die Kollimation von Single- bzw. Multimodefasern und von Laserdioden
- Eine 1/2-Pitch-Linse bildet ein Objekt in der Eintrittsfläche der Linse verkehrt herum in die Austrittsfläche ab (Vergrößerung $M = -1$)
- Eine 1-Pitch-Linse bildet ein Objekt in der Eintrittsfläche der Linse identisch in die Austrittsfläche ab (Vergrößerung $M = +1$). Ganzzahlige Vielfache der Pitchlänge erzielen die gleiche optische Abbildungseigenschaft. Sie werden häufig als Relaylinsen in der Endoskopie verwendet.

- Eine Endoskopobjektivlinse ist etwas länger als eine 1/4-Pitch-Linse. Befindet sich ein Objekt in einem Arbeitsabstand (je nach Linsenlänge) von 3 bis 24 mm, so wird dieses Objekt auf der Linsenaustrittsfläche abgebildet.

Ein endoskopisches Abbildungssystem besteht aus einer Endoskopobjektivlinse und einer Relaylinse [Kni, 2001]. Die Endoskopobjektivlinse bildet ein Objekt, welches sich im jeweiligen Arbeitsabstand der Linse befindet, auf seine Endfläche ab. Die Relaylinse, welche direkt an die Endfläche der Endoskopobjektivlinse geklebt ist, transportiert diese Abbildung nun von seiner Eintrittsfläche zu seiner Austrittsfläche. Ist die Austrittsfläche mit einem Faserbündel verbunden (verklebt), so wird das Bild auf die Faserbündelendfläche projiziert und kann wiederum durch das Faserbündel propagieren. Das Bild kann schließlich nach dem Austritt aus der Faserbündelendfläche detektiert werden. Das GRIN-Linsen-Objektiv dient zur Abbildung des Objekts auf das Faserbündel, das Faserbündel transportiert lediglich das 2-dimensionale Bild entlang seiner Achse. Somit wird die Auflösung durch die Anzahl der verwendeten Fasern im Faserbündel bestimmt. Ein derart aufgebautes Endoskopmikroskop ist aufgrund des Faserbündels flexibel und in alle gewünschten Richtungen beweglich. Das GRIN-Linsen-Objektiv kann in den gleichen räumlichen Ausmaßen bzgl. des Durchmessers wie das Faserbündel hergestellt werden. Aufgrund der planparallelen Oberflächen von GRIN-Linsen können nicht nur die Linsen selbst durch verkleben miteinander verbunden werden, sondern sie können auch mit einer Faser bzw. einem Faserbündel verbunden werden. Ein solches Abbildungssystem ist gegen mechanische Belastungen und Erschütterungen in den Grenzen der Belastbarkeit des Verbundklebers stabil. Des Weiteren gibt es keine beweglichen Komponenten, die bei der Verwendung anfällig gegenüber mechanischen Störungen sind.

3 Knorpel

In diesem Kapitel soll eine kurze Übersicht über des Aufbau und die Struktur des hyalinen Gelenkknorpels gegeben werden. Eine sehr ausführliche Abhandlung über den aktuellen wissenschaftlichen Stand ist in [Böt, 2007] gegeben. Im Weiteren wird die Pathophysiologie des Gelenkknorpels behandelt.

3.1 Aufbau und Struktur

Hyaliner Knorpel überdeckt die Knochenendflächen der beweglichen Gelenke des Menschen um einen nahezu reibungsfreien Ablauf (Reibungskoeffizient 0,02 - 0,002) der Bewegung zu ermöglichen [Mart, 2003]. Er ist für die Verteilung der einwirkenden Kräfte verantwortlich und reduziert die Beanspruchung der am Gelenkaufbau beteiligten Bindegewebe. Knorpel kombiniert in einzigartiger Weise Steifigkeit gegenüber Druckbelastungen mit Elastizität und niedrigem Reibungskoeffizienten [Bru, 2000].

Der Knorpel besitzt keine Blutversorgung, keine lymphatische Drainage und keine Nervenstruktur. Die Chondrozyten, der einzige Zelltyp innerhalb des Knorpelgewebes, sind durch die extrazelluläre Matrix von der Zufuhr der ernährenden Substanzen und den reparativen zellulären Mechanismen abgeschirmt. Somit können nur kleinere Schäden durch Neusynthese der Proteoglykane regeneriert werden, größere Schäden werden zu einem Dauerschaden.

3.1.1 Zusammensetzung des Gelenkknorpels

Hyaliner Knorpel besteht zum einen aus Zellen und zu anderen aus einer wasserhaltigen Matrix. Diese extrazelluläre Matrix besteht zu 60-80% aus Wasser, zu 10-20% aus Kollagen Typ 2 und zu 5-7% aus Aggrecan (Proteoglykan-Monomer das über ein Link-Protein mit Hyaluronsäure Aggregate bildet). Die restlichen <5% sind diverse andere Bestandteile.

Chondrozyten

Chondrozyten sind der einzige Zelltyp im hyalinen Gelenkknorpel. Das Zellvolumen beträgt ca. 1-3% des Knorpelgesamtvolumens [Bru, 2000]. Chondrozyten sind ausdifferenzierte, mesenchymale Zellen die nach Zusammenlagerung knorpelspezifische Kollagene, Proteoglykane und nicht-kollagene Proteine synthetisieren können. Von der gebildeten Matrix separiert, nehmen die Chondrozyten ihre typische polygonale Zellform an. Es gibt keine interzellulären Kontakte, die Versorgung erfolgt durch Diffusion der Versorgungsstoffe durch die extrazelluläre Matrix. Chondrozyten sind dennoch metabolisch sehr aktiv mit der Synthese und dem Abbau von Matrixmolekülen. Obwohl ausgereifte Chondrozyten über Jahrzehnte ihre Form und Aktivität nicht ändern, sind sie in der Lage, den komplexen Aufbau des hyalinen Knorpels erfolgreich aufrechtzuerhalten.

Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels besteht im Wesentlichen aus den zwei Komponenten, Wasser und einem Netzwerk von strukturellen Gewebemolekülen. Diese Makromoleküle bestehen aus Kollagenen (60%), Proteoglykanen (20-25%) und nicht-kollagenen Proteinen und Glykoproteinen (15-25%).

Wasser

Das Wasser befindet sich hauptsächlich in der extrazellulären Matrix, wobei ca. 30% im intrafibrillären Raum gebunden ist. Es enthält Gase, kleine Proteine und viele Kationen, die eine Balance zu den negativ geladenen Proteoglykanen herstellen. Der Wassergehalt an der Oberfläche ist höher als in den tieferen Schichten des Knorpels.

Kollagene

Kollagene bilden die Rahmenkonstruktion des Knorpels. Unter den vielen vorkommenden Kollagentypen ist der Typ II die Hauptkomponente. Des Weiteren seien noch Typ IX und XI, die an der Quervernetzung beteiligt sind, sowie Typ VI der bei der zellulären Einbindung der Chondrozyten in die extrazelluläre Matrix beteiligt ist, zu nennen.

Proteoglykane

Die Hauptaufgabe der Proteoglykane besteht in der chemischen und mechanischen Bindung des Wassers in der extrazellulären Matrix. Dadurch entsteht ein beträchtlicher Quellungsdruck, der für die Abfederung der auf den Knorpel einwirkenden Druckkräfte verantwortlich ist. Zusammen mit Verbindungsproteinen können Proteoglykane zusammen mit Hyaluronsäure große Aggregate (bis zu $10\mu\text{m}$) bilden.

3.1.2 Struktur des Gelenkknorpels

Die extrazelluläre Matrix stellt durch sein Netz aus kollagenen Fasern die Hauptfunktion des Knorpels, die Zugfestigkeit und Festigkeit gegenüber Scherkräften, bereit [Rud, 1998]. Die Interaktion zwischen Matrix und Chondrozyten ermöglicht eine Aufrechterhaltung des Knorpelgewebes über mehrere Jahrzehnte. Dabei stellt die Matrix einen wesentlichen mechanischen Schutzfaktor der Chondrozyten vor äußeren Belastungen dar. Eine weitere wichtige Funktion der Matrix ist die Signalübertragung für die Chondrozyten. Die durch mechanische Belastungen entstandenen Signale werden auf die Chondrozyten übertragen, die ihrerseits durch Änderung ihrer metabolischen Aktivität darauf reagieren.

Aufgrund morphologischer Unterschiede der Knorpelzellen und der umgebenden Matrix ist es möglich, vier Zonen des hyalinen Gelenkknorpels zu beschreiben [Mar, 2000a].

Superfizielle Zone

Die oberflächlichste Schicht ist eine dünne Gleitoberfläche mit einem hohen Kollagenanteil und einem niedrigen Proteoglykangehalt. Feine, parallel zur Gelenkoberfläche angeordnete Kollagenfibrillen bilden die *Lamina splendens* direkt an der Oberfläche. Diese

Schicht dient als Barriere für Makromoleküle, Proteine und isoliert somit das Knorpelgewebe vom Immunsystem. Eine Zerstörung dieser Schicht ermöglicht die Passage von Molekülen, welche synoviale Immunreaktionen oder Entzündungsreaktionen auslösen können.

Transitionale Zone

Diese Zone besitzt Kollagenfibrillen mit größerem Durchmesser und weist eine höhere Konzentration an Proteoglykanen auf.

Radiale Zone

In dieser Zone sind die größten Kollagenfibrillen, die höchste Konzentration an Proteoglykanen und die niedrigste Wasserkonzentration zu finden. Die spheroid erscheinenden Knorpelzellen sind säulenartig angeordnet und verlaufen wie die parallel angeordneten Kollagenfibrillen senkrecht zur Gelenkoberfläche. Die Kollagenfibrillen sind zwischen dem kalzifizierten und unkalzifizierten Knorpelgewebe, der sogenannten *tide mark*, verankert.

Zone des kalzifizierten Knorpels

Die tiefste Zone besteht aus mineralisierter Matrix und bildet den Übergang zum subchondralen Knochen.

3.2 Pathophysiologie des Gelenkknorpels

3.2.1 Arthrose

Unter physiologischen Bedingungen stehen die anabolen und die katabolen Aktivitäten der Chondrozyten im Knorpelgewebe im Gleichgewicht. Somit bleibt der Knorpel in seinen strukturellen und funktionellen Eigenschaften vollständig erhalten. Ist das Gleichgewicht zwischen intensiviertem Abbau einerseits und Neusynthese von Makromolekülen und deren struktureller Reorganisation andererseits gestört, so kommt es zu einer Degeneration der Knorpelmatrix [Fri, 2003]. Das durch die Degradation gestörte Gewebe ist mechanisch nicht mehr belastbar und zerfällt. Die wichtigsten Auslösemechanismen

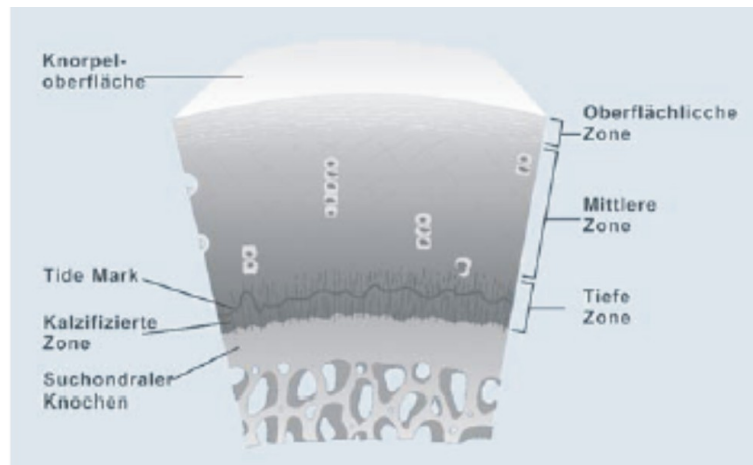


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus des Gelenkknorpels [Res, 2004]

sind eine erworbene oder altersbezogene Veränderung der Chondrozytenfunktionen, eine dysregulierte Zytokinaktivität zugunsten katabolischer Zytokine und mechanische Über- oder Unterbelastung des Knorpels [Heg, 2006].

Die derzeit gültige Definition des Begriffs Arthrose von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) lautet: *Die Osteoarthrose ist eine nicht entzündliche Erkrankung mit entzündlichen Episoden. Sie ist eine Folge sowohl mechanischer als auch biologischer Einflüsse, welche das normale Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau im Gelenkknorpel stören. Ausgelöst durch verschiedene Faktoren manifestiert sich das Ungleichgewicht in morphologischen, biochemischen, molekularen und biomechanischen Veränderungen. In Verbindung mit nicht systemischen entzündlichen Episoden führen diese Vorgänge zur Erweichung, Auffaserung und Zerstörung der Gelenkoberfläche, sowie zum Verlust von artikulärem Knorpel und einer Sklerose des subchondralen Knochens mit Ausbildung von Osteophyten.*

Die Faktoren, die in der Arthroskopie makroskopisch gesehen und gefühlt werden (Glanzverlust, Erweichung), die Veränderungen, die in der MRT zu erkennen sind (Signal-, Kontur-, Dickenveränderung) und die Merkmale, die im Röntgenbild abbildet werden (Osteophyten, Sklerose, Verschmälerung der Gelenkspalten) sind alles Erscheinungsformen der Arthrose in verschiedenen Fortschrittsstadien. In einer vereinfachten Darstellung lässt sich der Krankheitsverlauf in drei Stadien unterteilen [Hem, 2007]:

Stadium 1 - Zerbrechen der Matrix

Zu Beginn der Degeneration kommt es zum Zerbrechen des Matrix-Netzwerkes auf Molekularebene. Dies geschieht entweder kurz vor oder kurz nach der ersten Fibrillation der Knorpeloberfläche. Es werden vor allem die Querverbindungen aufgelöst, wodurch die Festigkeit des Knorpels abnimmt.

Stadium 2 - Chondrozytenaktivierung

In diesem Stadium versuchen die Chondrozyten den Schaden des Knorpels zu kompensieren. Dies geschieht durch ein unkontrolliertes Vermehren der Chondrozyten wobei sich Zell-Cluster bilden. In diesen Clustern sind die Zellen von neu synthetisierten Matrixmolekülen umgeben. Dieser Zustand kann über Jahre andauern. Es kommt zur Degeneration der in den Zwischenräumen liegenden Matrix und somit zur Destabilisierung des gesamten Kollagen-Netzwerkes.

Stadium 3 - Gewebeuntergang

In dieser letzten Phase versagen schließlich auch die Chondrozyten den Knorpeluntergang auszugleichen. Es kommt zum kompletten Verlust der Knorpelschicht.

3.2.2 Knorpeldefekte

Neben der Arthrose, bei der das gesamte Gelenk betroffen ist, gibt es Knorpelschäden, die kein Ausdruck einer Arthrose sind. Zur Arthrose gehört zwar immer ein Schaden der knorpeligen Gelenkfläche, doch stellt dieser nur immer eines von vielen Zeichen der Erkrankung des komplexen Systems Gelenk dar [Bru, 2000]. Die Osteoarthrose beinhaltet neben Knorpeldefekten Veränderungen aller an der Gelenkbildung beteiligten Gewebe wie der Synovialis, des subchondralen epiphysären als auch metaphysären Knochens, der Bänder, Kapsel und der Muskeln [Buc, 1994]. Die Arthrose wird somit Gelenkfehlfunktion aufgrund von strukturellen Schäden, die letztlich zum Versagen des „Organs“ Gelenk führen können, angesehen. Der Knorpelschaden ist ein Teil, wenn auch ein zentraler, des Gesamtschadens am Gelenk. Ein Knorpelschaden, entstanden durch eine traumatische Läsion, ist eine mechanische Verletzung des Knorpelgewebes, die auf eine akute, mechanische Einwirkung zurückzuführen ist und nicht zwangsläufig zu einer Arthrose oder

Substanzdefiziten führen muss. Neben Einzeltraumata können auch Impulsbelastungen mit einer hohen Repetition zu einem derartigen Defekt führen. Gelenkknorpelverletzungen werden in drei Typen eingeteilt [Heg, 2006]:

- Verletzungen der Gelenkoberflächen, die keine sichtbaren Unterbrechungen der Gelenkoberfläche zeigen, aber einen Knorpelschaden mit eventueller Beteiligung subchondralen Knochens aufweisen.
- Chondrale Defekte bei denen lediglich die Knorpelschicht betroffen ist.
- Osteochondrale Defekte mit einer Schädigung bis in den subchondralen Knochen hinein.

Neben den traumatischen Ursachen eines Knorpelschadens, kann auch die Fehlstellung von Gelenken als präarthrotische Deformität zu einem Knorpelschaden bzw. zu einer Arthrose führen. Alle genannten Ursachen für einen Knorpelschaden haben ein Ungleichgewicht zwischen der Belastung des Knorpels und dessen Belastbarkeit gemeinsam.

3.2.3 Regenerationspotential von Gelenkknorpel

Die Regenerationsfähigkeit von hyalinem Gelenkknorpel ist sehr gering. Die Reaktion des Knorpelgewebes auf eine Verletzung unterscheidet sich von der klassischen dreiphasigen Wundheilung vaskulierter Gewebe, bestehend aus Nekrose, Entzündung und Reparatur, durch das Fehlen einer entsprechenden Blutversorgung und Migration von Entzündungszellen in den Defekt [Man, 1982]. Auch wenn Chondrozyten imstande sind, ihre synthetisierende Aktivität zu steigern um damit zerstörte Matrix zu ersetzen, können sie nicht an den Ort des Geschehens gelangen.

Die Regenerationsmechanismen für die unterschiedlichen Traumen können sehr unterschiedlich verlaufen. Mittel- und langfristig führen solche Verletzungen jedoch häufig auch zu Arthrose. Reicht das Trauma bis in den subchondralen Bereich hinein, kommt es zur Beteiligung des Gefäßsystems am Reparaturprozess mit der Ausbildung von Faserknorpel [Mar, 2010]. Aus dem Knochenmarkraum tritt Blut in das Defektareal ein und bildet ein Fibringerinnsel. Das Gerinnsel wird in der Folgezeit durch multipotente, mesenchymale Stammzellen ersetzt. Die Zellen sind in der Lage, neues faserknorpeliges Regeneratgewebe aufzubauen. Dieses besitzt eine andere Zusammensetzung aus Kollagenen und hat minderwertigere Eigenschaften bezüglich der Widerstandsfähigkeit gegenüber Druck- und Scherkräften.

Grad 0=	Normalbefund, intakter Knorpel mit glatter Oberfläche und guter Konsistenz
Grad 1=	Erweichung der Oberfläche, aber glatt erhaltene Oberfläche ohne Fibrillation
Grad 2=	Oberfläche aufgefasert mit Einrissen und deutlicher Fibrillation
Grad 3=	tiefe Fissuren, Ulcus bzw. Krater mit instabilen und untermierten Rändern, subchondraler Knochen noch nicht erreicht
Grad 4=	Vollschicht-Knorpelverlust bis auf den subchondralen Knochen

Tabelle 3.1: Outerbridge Klassifikation zur Einteilung von Knorpelschäden (nach [Bös, 2003])

3.3 Beurteilung und Diagnostik eines Knorpelschadens

Für die makroskopische Beurteilung von Knorpelschäden z.B. bei der Arthroskopie, hat sich die Klassifikation nach *Outerbridge* bewährt [Bös, 2003]. Die Klassifikation unterteilt den Fortschritt von Knorpelschäden in fünf Kategorien, wobei die erste Kategorie (Grad 0) einen gesunden, intakten Knorpel definiert. Die Befunde zur Charakterisierung der einzelnen Kategorien (Grad 0-4) sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Grad 0 ist gesunder Gelenkknorpel mit glatter Oberfläche und hohem Proteoglykangehalt. Grad 1 ist durch einen leichten Proteoglykanverlust und Fissuren in der oberflächlichen Tangentialschicht gekennzeichnet. In Grad 2 sind ein weiterer Proteoglykanverlust, tiefere Fissuren und die Bildung von Brutnestern erkennbar. Grad 3 ist durch Fissuren und Defekte bis zum verkalkten Knorpel charakterisiert. Der Grad 4 ist durch einen kompletten Knorpelverlust mit Eröffnung des subchondralen Markraums gekennzeichnet.

Eine Veranschaulichung der Arthrostadien ist in Abbildung 3.2 gegeben. Mittels angefärbten histologischen Schnitten kann die Morphologie von humanem Knorpelgewebe gut visualisiert werden. Der Zerfall der extrazellulären Matrix mit fortschreitendem Arthrosegrad ist deutlich erkennbar. Ebenso sind charakteristische Erscheinungen wie eine Auffaserung der Oberfläche und die Bildung von Chondrozytenclustern sichtbar.

Die derzeit verwendeten bildgebenden Diagnosemethoden sind das Röntgenbild, die MRT

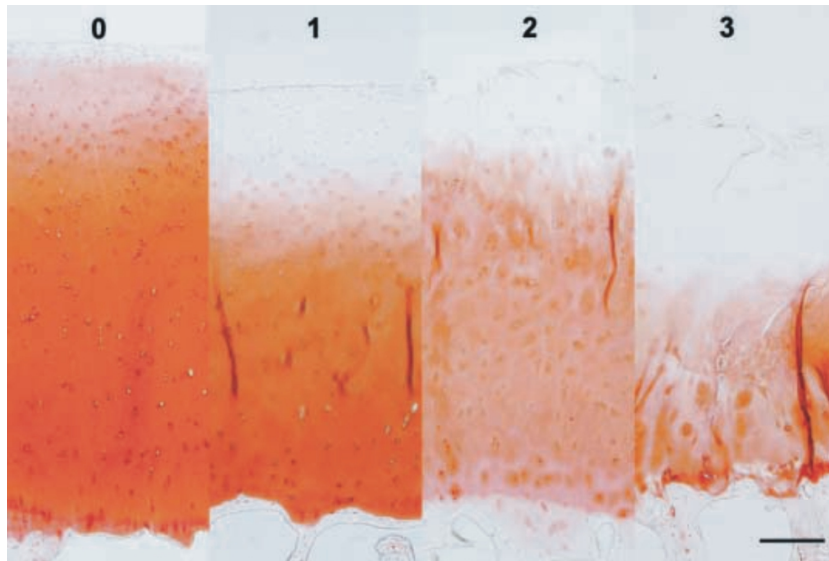


Abbildung 3.2: Histologische Arthrosestadien von links nach rechts mit zunehmendem Schädigungsgrad (Safranin-O-Färbung, Balken repräsentiert $400\ \mu\text{m}$) aus [Pul, 2001]

sowie die Arthroskopie. In einer Validierung dieser Methoden wurde von [Spa, 2007] festgestellt, dass klinische, radiologische und kernspintomographische Untersuchungen bei höhergradigen Knorpelschäden in guter Korrelation mit den arthroskopischen Befunden stehen. Bei der Interpretation initialer Knorpelschäden ist jedoch eine hohe Rate falsch-positiver Ergebnisse zu verzeichnen, sodass keine dieser Untersuchungsmethoden geeignet ist, initiale Knorpelläsionen sicher auszuschließen.

4 Experimentelle Methoden

4.1 Aufbau des 2-Photonen Laser-Scanning Mikroskops

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Detektionssysteme des 2-Photonen Mikroskops vorgestellt. Die Fluoreszenzanregung ist, bis auf den endoskopischen Aufbau, in allen Aufbauvarianten weitestgehend identisch. Die wesentlichen Unterschiede bestehen im Detektionspfad des Fluoreszenzsignals. Der multifokale, multispektrale descanned Modus wurde von J. Martini entwickelt und in [Marti, 2006] sowie [Berg, 2007] vorgestellt. Ein Vorgängermodell zu diesem Aufbau wurde in [Marti, 2007] veröffentlicht. Da dieser Modus unter anderem für die Messung von humanem Knorpelgewebe verwendet wurde, wird er kurz vorgestellt.

4.1.1 Paralleler non-descanned EMCCD-Kamera/PMT Detektionsmodus

Das NIR-Anregungslicht wird durch einen durchstimmbaren, modengekoppelten Ti:Sa-Laser (Tsunami, Spectra-Physics) erzeugt. Als Pumplaser wird ein CW-Laser bei 532 nm und einer Leistung von 8,5 W verwendet (Millennia X, Spectra Physics). Der Laser wird in ein TriM-Scope (LaVision Biotec GmbH) eingekoppelt. Dies besteht im Wesentlichen aus vier Untereinheiten. Zunächst durchläuft der Laser zur Intensitätsmodulation einen Polarisator und einen Analysator. Danach folgt ein Linsenpaar zur Strahlaufweitung. Diese Einheit ist auf einer optischen Schiene angeordnet. Anschließend durchläuft der Laser einen Prismen-Kompressor um dem Laserpuls einen Chirp aufzuprägen. Der Prismen-Kompressor besteht aus zwei Prismen und ist so ausgelegt, dass er die gesamte Dispersion des Aufbaus kompensiert. Somit kann gewährleistet werden, dass der ultrakurze Laserpuls mit einer Pulsdauer von 100 fs auch mit dieser Pulsdauer im Fokus des Mikroskops auftritt und nicht zeitlich verbreitert wird. Die nächste Einheit ist ein Strahlvervielfacher und besteht aus einem länglichen, halbdurchlässigen Spiegel sowie mehreren 100%-Spiegeln [Nie, 2000]. Der halbdurchlässige Spiegel kann in den Strahlen-

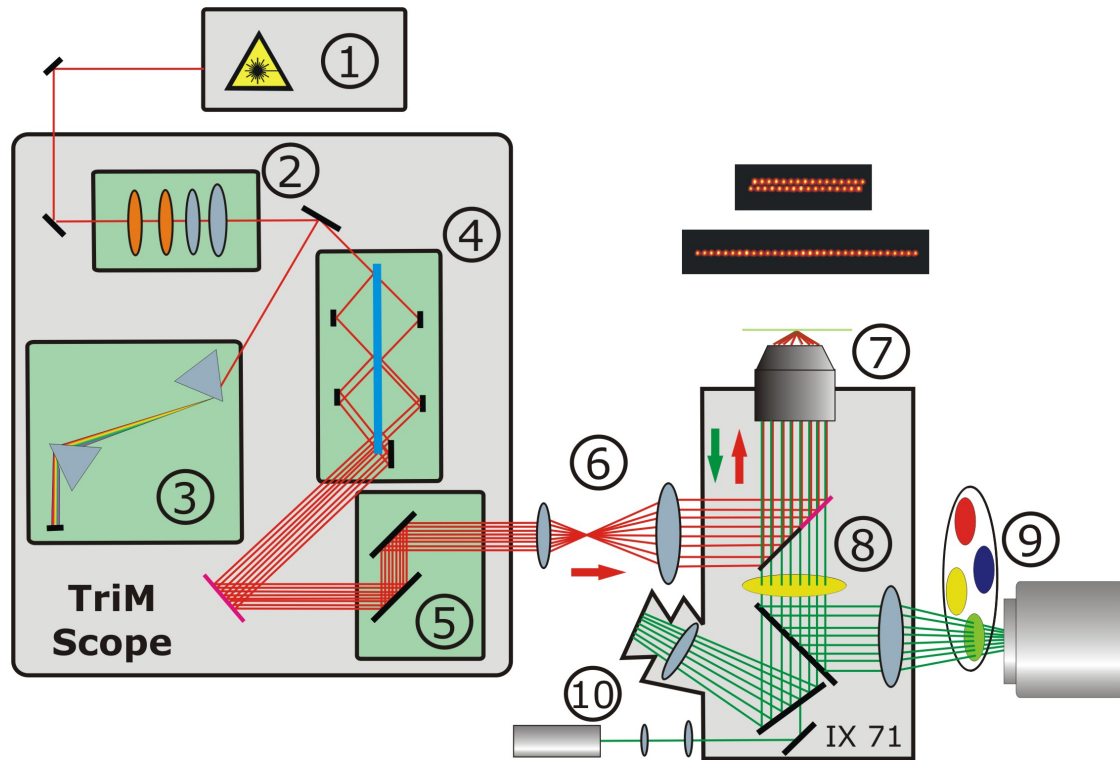


Abbildung 4.1: Aufbau 2-Photonen Laser-Scanning Mikroskop: 1) Ti:Sa-Laser; 2) Polarisator und Analysator, Strahlaufweitung; 3) Prismen-Kompressor; 4) Strahl-Vervielfacher; 5) Scanspiegel; 6) Strahl-Aufweitung; 7) Mikroskop-Objektiv; 8) Dichroitischer Spiegel, Kurzpassfilter; 9) Filterrad, EMCCD-Kamera; 10) PMT

gang zwischen den 100%-Spiegeln gefahren werden und somit eine Vervielfachung des Strahls bewirken. Es können 1,2,4,8,16,32 oder 64 parallele Strahlen erzeugt werden. Die Strahlen besitzen jeweils die gleiche mittlere Intensität. Die letzte Einheit im TriM-Scope bilden zwei Silber-beschichtete Scan-Spiegel. Diese Spiegel werden piezoelektrisch angesteuert, sodass ein Spiegel in x-Richtung und der andere Spiegel in y-Richtung bewegt werden kann. Nach den Scanspiegeln verlässt der Laser das TriM-Scope in eine weitere Strahlaufweitung. Diese bestehend aus zwei Linsen und weitet den Laserstrahl zur vollständigen Ausleuchtung des Mikroskopobjektivs auf. Diese Einheit befindet sich zwischen dem TriM-Scope und dem Mikroskopstativ und ist vollständig verrohrt. Im Mikroskop wird der aufgeweitete Strahl über einen dichroitischen Spiegel (680dcspxr, Chroma Technology Corp.), welcher im Revolver des Mikroskops eingebaut ist, auf ein Mi-

kroskopobjektiv umgeleitet. Die verwendeten Objektive sind ein 60x-Objektiv (UPLAPO60XW3/IR) mit einem Arbeitsabstand von 0,28 mm und $NA = 1.2$ und ein 20x-Objektiv (XLUMPLFL20XW) mit einem Arbeitsabstand von 2 mm und $NA = 0.95$ von Olympus. Das in der Probe via 2-Photonen-Anregung erzeugte Fluoreszenzlicht wird zunächst vom Mikroskopobjektiv aufgesammelt und durch den dichroitischen Spiegel vom anregenden Laserlicht getrennt. Das durch den Dichroiten transmittierende sichtbare Licht kann nun mittels Okular, EMCCD Kamera (IXON DV887ECS-UVB, Andor Technology) oder PMT (Hamamatsu 7422, 5783) detektiert werden. Die EMCCD-Kamera ist ein 2-dimensionaler Detektor, der ein komplettes Bild mit einer Bildwiederholrate von ca. 20 Hz aufnehmen kann. Wird diese Detektion verwendet, wird die Belichtungszeit der Kamera mit der Scanfrequenz des Scanners synchronisiert, sodass mit einem Scandurchgang ein Bild aus dem CCD-Chip ausgelesen wird. Bei sehr lichtarmen Proben kann die Belichtungszeit auf ganzzahlige Vielfache der Scanzeit mit dem Nachteil eines erhöhten Rauschens erhöht werden. Die PMT's sind eindimensionale Detektoren, die für jeden einzelnen Scanpunkt die Fluoreszenzintensität detektieren. Ein mit der Scanposition synchronisiertes Auslesen dieser Daten erzeugt ein 2-dimensionales Bild. Dieser Aufbau ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Der PMT kann sowohl am linken Port des Mikroskopstativs (wie in Abb. 4.1 gezeigt) sowie am rechten Port des Stativs angebracht werden. Die Kamera kann lediglich am rechten Port angebracht werden. An diesem Port ist zusätzlich ein Filterrad angebracht. Es kann bis zu acht verschiedene Filter aufnehmen und ermöglicht somit die Fluoreszenzdetektion in ausgewählten Wellenlängenbereichen.

4.1.2 Multifokaler multispektraler descanned Detektionsmodus

Die Anregung erfolgt identisch zu 4.1.1. Für diesen Detektionsmodus werden mit dem Strahl-Vervielfacher acht in einer Reihe liegende Foki erzeugt. Im Gegensatz zu 4.1.1 wird der dichroitische Spiegel im Mikroskop durch einen 100%-Spiegel ersetzt. Somit wird das Fluoreszenzlicht zu den Scanspiegeln zurückreflektiert und gelangt nicht zu den Detektoren an den beiden Mikroskopports. Nach dem, entgegengesetzt zum Anregungslicht, Durchlaufen der Scanspiegel wird es durch einen dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht getrennt. Da die Verweildauer der Scanspiegel in einer Scanposition länger ist als die Zeit, die zur Erzeugung des Fluoreszenzlichts notwendig ist, sind diese noch in derselben Position. Als Folge werden acht ruhende, voneinander getrennte Fluoreszenzpunkte erzeugt. Diese werden in einem Geradsichtprisma (331120, 71 mm, Linos Photonics) spektral aufgespalten und auf ein 8x8-multianoden PMT abgebildet. Der Aufbau wird

so einjustiert, dass jede Spalte des PMT-Arrays das Spektrum eines Fokus aufnimmt. Effektiv werden somit acht gleichzeitige Bilderstapel aufgenommen, die jeweils um die Distanz der Fokuspunkte innerhalb der Probe voneinander verschoben sind. Jeder Bilderstapel besteht aus acht Einzelbildern, die jeweils einen bestimmten Spektralbereich aufnehmen. Durch entsprechende Justage der in diesem Detektionspfad verwendeten Linsen sowie durch axiales Verschieben des Multianodendetektors lässt sich der aufzunehmende Spektralbereich variieren. Um den Vorteil der achtfachen Aufnahme bezüglich der Rauschminderung ausnutzen zu können, müssen die einzelnen Bilderstapel gegeneinander verschoben werden, damit der Versatz durch die unterschiedlichen Fokuspunkte ausgeglichen wird. Dazu muss zunächst ein Verschiebevektor bestimmt werden. Dies geschieht durch die Aufnahme einer räumlichen Punktquelle wie z.B. eines Quanten-Dots. Dieser Punkt ist in allen Bilderstapeln räumlich sehr exakt bestimmbar und kann somit als Grundlage für die Bestimmung eines Verschiebevektors dienen. Anschließend können die Bilder entsprechend dem Verschiebevektors gegenseitig verschoben und schließlich überlagert werden. Dieser Aufnahmemodus ist sehr sensibel bezüglich der Justage. Somit reichen schon leichte thermische Veränderungen zwischen zwei Messtagen für eine Dejustage aus. Als Folge muss der Verschiebevektor an jedem Messtag individuell bestimmt werden.

Spektrum des Femtosekundenlasers

Ein abgekoppelter Teilstrahl, kurz nach dem Eintritt in das TriM-Scope, wird dazu genutzt, das Spektrum des Lasers zu messen. Dazu wird ein faser-optisches Spektrometer (Ocean Optics USB 2000, 700 nm - 1140 nm) verwendet. Für den technischen Ablauf ist die Messung des Spektrums sehr hilfreich, da anhand des Spektrums leicht zu erkennen ist, ob sich der Laser im Impulsbetrieb befindet. Befindet sich der Ti:Sa-Laser nicht im Pulsbetrieb, ist das aufgenommene Spektrum deutlich schmalbandiger als im Pulsbetrieb. Diese Messung dient somit hauptsächlich der Überprüfung des Lasers.

Pulslängenmessung

Die Pulslängenmessung ultrakurzer Laserpulse beruht auf dem Prinzip der zeitverzögerten Überlagerung eines optischen Impulses mit sich selbst. Daraus könne Rückschlüsse auf Impulsform und Impulsdauer gezogen werden. Der eingestrahelte Laserstrahl wird durch einen Strahlteiler in einen Referenzarm und einen Probenarm aufgespalten. Am

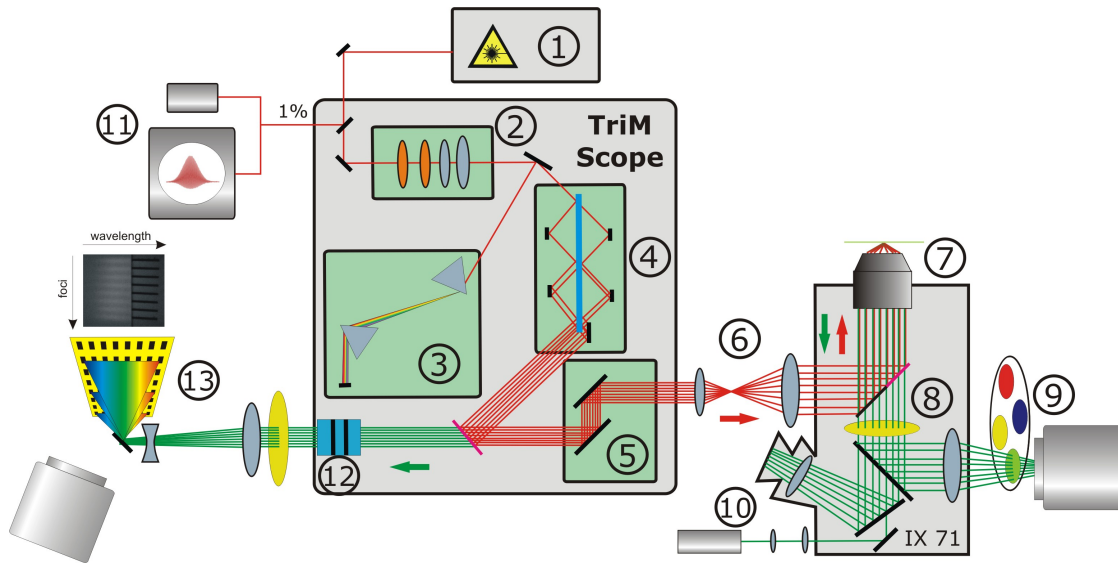


Abbildung 4.2: Multifokaler multispektraler descanned Aufbau: 1) Ti:Sa-Laser; 2) Polarisator und Analysator, Strahlaufweitung; 3) Prismen-Kompressor; 4) Strahl-Vervielfacher; 5) Scanspiegel; 6) Strahl-Aufweitung; 7) Mikroskop-Objektiv; 8) Dichroitischer Spiegel, Kurzpassfilter; 9) Filterrad, EMCCD-Kamera; 10) PMT; 11) Spektrometer/Autokorrelator; 12) Geradsichtprisma; 13) Multianoden-PMT

Ende des Referenzarms befindet sich ein piezoelektrisch angetriebener Endspiegel. Dieser wird durch eine sinusförmige Anregung in Schwingung versetzt, was eine Veränderung der Laufstrecke durch den Referenzarm zur Folge hat. Der Probenarm besitzt einen ortsfesten Endspiegel. Beide Teilstrahlen werden anschließend in einem frequenzverdoppelnden Kristall überlagert. Die Intensität des frequenzverdoppelten Signals hängt von der zeitlichen Verzögerung τ ab [Tre, 2005]. Der zeitliche Intensitätsverlauf entspricht einer Autokorrelationsfunktion die mathematisch durch

$$I_{2\omega}(t, \tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} |E_{\omega}(t) + E_{\omega}(t - \tau)|^2 dt \quad (4.1)$$

ausgedrückt wird.

Der Autokorrelator konnte im Aufbau an die Stelle des Spektrometers platziert werden. Durch Justage des Autokorrelators wurde der Teilstrahl an dieser Stelle in den Autokorrelator eingekoppelt. Die gemessene interferometrische Autokorrelationsfunktion ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Der Abstand der Interferenzmaxima beträgt $\Delta t = \lambda_0/c = 2,67$ fs

[Kra, 1992]. Um die FWHM der Autokorrelationsfunktion zu bestimmen, wird die Anzahl der Interferenzmaxima oberhalb von 50% der Autokorrelationsfunktion gezählt und mit Δt multipliziert. Bei einer Anzahl von 51 Maxima ergibt sich eine Breite von 136 fs. Mit dem Formfaktor von $\sqrt{2}$ [Dem, 2007] zwischen der Autokorrelationsbreite und der Laserpulsbreite für einen Gauß-förmigen Laserpuls, ergibt sich die Laserpulsdauer von $96 \pm 3,7$ fs.

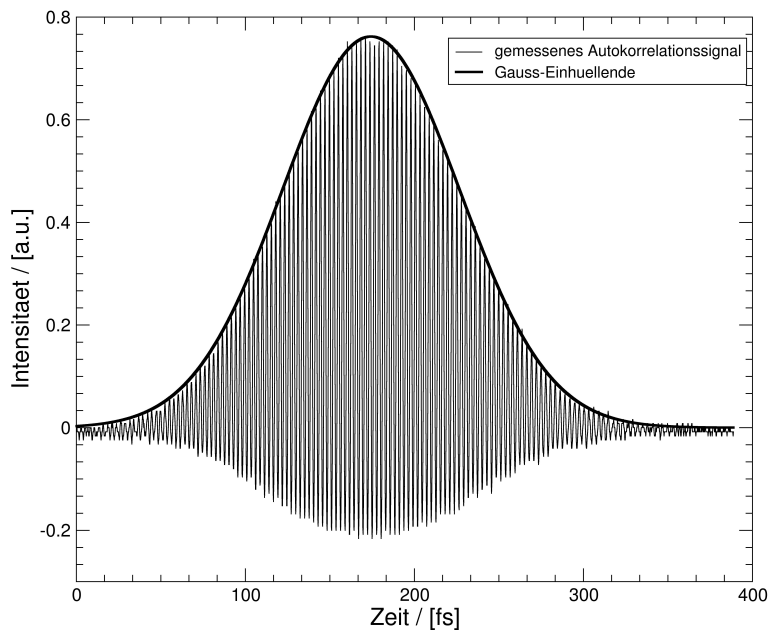


Abbildung 4.3: gemessene Autokorrelationsfunktion, ermittelte Pulslänge $\tau = 96$ fs

4.2 Fluoreszenz-Lebenszeit Imaging (FLIM) Aufbau

Um das TCSPC-System zur Messung der Fluoreszenzlebenszeit in den vorhandenen Aufbau zu integrieren, mussten eine Photodiode zur Messung des Referenzsignals und ein an das System (Pico-Harp 300, Pico Quant GmbH) angeschlossener PMT aufgebaut werden. Die Messung basiert auf der wiederholten, präzisen Zeitmessung einzelner Photonen eines Fluoreszenzsignals. Als Referenzsignal dient der Anregungslaser (Tsunami, Spectra-Physics), der Referenzpuls wird von einer Photodiode detektiert. Dazu konnte der im TriM-Scope abgekoppelte Teilstrahl verwendet werden, der zuvor schon für das

Spektrometer bzw. den Autokorrelator verwendet wurde. Die Fluoreszenzphotonen werden an einem Mikroskopport mit einem Photomultiplier (Hamamatsu H5783) erfasst. Die Photodiode sowie der Photomultiplier sind jeweils mit der Auswertelektronik verbunden. Zwischen dem PMT und der Elektronik wurde ein Vorverstärker (PAM 102-P, PicoQuant GmbH) in Reihe geschaltet (Abb. 4.4). Die beiden Detektoren messen die auftreffenden Pulse bzw. Photonen und geben die Information in Form eines elektrischen Pulses an die angeschlossene Elektronik weiter. Die Länge der verwendeten Leitungskabel wurde beim Aufbau des Systems berücksichtigt und angepasst. Die Elektronik wertet die Ankunftszeiten der beiden Signale aus und verarbeitet sie zu einer Zeitdifferenz in einem Histogramm. Wird mit dem System Lebenszeit-Imaging durchgeführt, wird für jedes Pixel des 2-dimensionalen Bildes ein einzelnes Histogramm angelegt. Diese Prozedur benötigt eine hohe Speicherkapazität und nimmt eine deutlich höhere Aufnahmezeit in Anspruch als eine Messung der Fluoreszenzintensität. Das Ergebnis kann sehr anschaulich mit einer Farbkodierung der Fluoreszenzlebenszeit dargestellt werden.

4.3 Mikroendoskopischer Aufbau

Ein Mikroendoskop kann in verschiedenen Bauformen aufgebaut werden. Sie sind in Kapitel 2.6 beschrieben. Die Anwendung in der Knorpeldiagnostik erfordert eine möglichst kompakte Bauweise. Des Weiteren sind für eine spätere Anwendung in der diagnostischen Medizin eine hohe Robustheit und eine einfache Handhabung wichtig. Ein möglichst geringer Kostenfaktor ist für eine spätere Verwendung als Medizinprodukt ebenfalls ein Faktor der beachtet werden sollte. Vor allem aber sollte das System in den bestehenden Aufbau integriert werden können. Die genannten Anforderungen erfüllt der Aufbau mit einem Faserbündel, dessen proximales Ende mit einer Scaneinheit abgerastert wird und an dessen Ende ein GRIN-Linsen-Objektiv angebracht ist. Das verwendete Faserbündel besteht aus 30.000 einzelnen optischen Fasern und besitzt einen Durchmesser von ca. 1 mm inklusive einer Schutzhülle (Sumitomo, Fused coherent imaging guide). An das Ende des Faserbündels wird ein Objektiv aus zwei GRIN-Linsen (GRINTECH GmbH, GT-IFRL-100-inf-20-NC + GT-IFRL-100-cus-50-NC) angeklebt. Dieses System wird mit seinem proximalen Ende in den Fokus eines 10x Objektivs im Mikroskop gebracht. Somit wird das anregende Laserlicht in eine Faser eingekoppelt, durchläuft diese bis zum GRIN-Linsen-Objektiv und tritt dort fokussiert aus. Der Arbeitsabstand dieses Objektivs beträgt 300 μm . Das in diesem Fokus erzeugte Fluoreszenzlicht wird vom

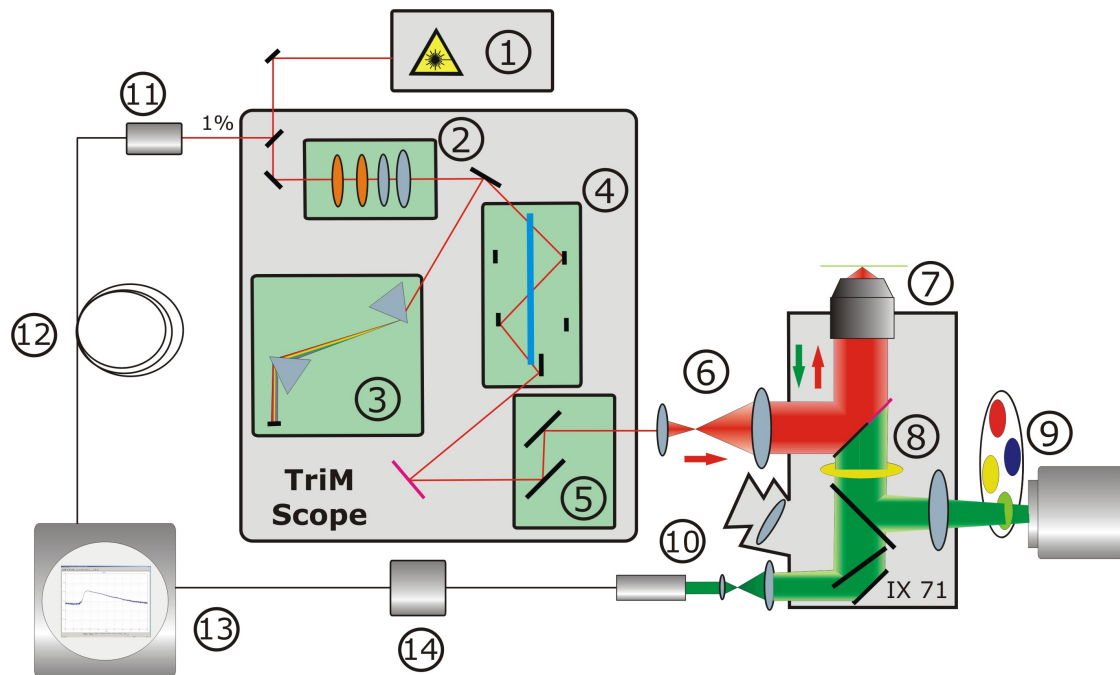


Abbildung 4.4: Aufbau der Messung mit dem FLIM-Detektor: 1) Ti:Sa-Laser; 2) Polarisator und Analysator, Strahlaufweitung; 3) Prismen-Kompressor; 4) Strahl-Vervielfacher; 5) Scanspiegel; 6) Strahl-Aufweitung; 7) Mikroskop-Objektiv; 8) Dichroitischer Spiegel, Kurzpassfilter; 9) Filterrad, EMCCD-Kamera; 10) PMT; 11) Photodiode; 12) Delaystrecke; 13) Pico-Harp 300; 14) Vorverstärker;

GRIN-Linsen-Objektiv aufgesammelt und erneut durch das Faserbündel geleitet. Tritt es aus dem Faserbündel aus, wird es vom Objektiv des Mikroskops aufgesammelt und analog zu den vorherigen Aufbauten detektiert. In Abbildung 4.5 wird der Laser mit einem ortsfesten Fokus in das Faserbündel eingekoppelt. In den Fokus des GRIN-Linsen-Objektivs am anderen Ende des Faserbündels wird eine IR-Viewer Card platziert. Eine IR-Viewer Card wandelt das auftreffende infrarote Laserlicht in sichtbares Licht um. Dieses Licht propagiert entgegengesetzt zum Anregungslicht durch die gleiche Faser zurück und kann als erleuchtete Einzelfaser detektiert werden. Der Lichtweg entspricht exakt der 2-Photonen Fluoreszenzerzeugung.

Da die ultrakurzen Laserpulse in der optischen Faser eine positive Dispersion erfahren (siehe Kap. 2.3.1), führt dies zu einem zeitlichen Verlaufen und somit einer Verlänge-

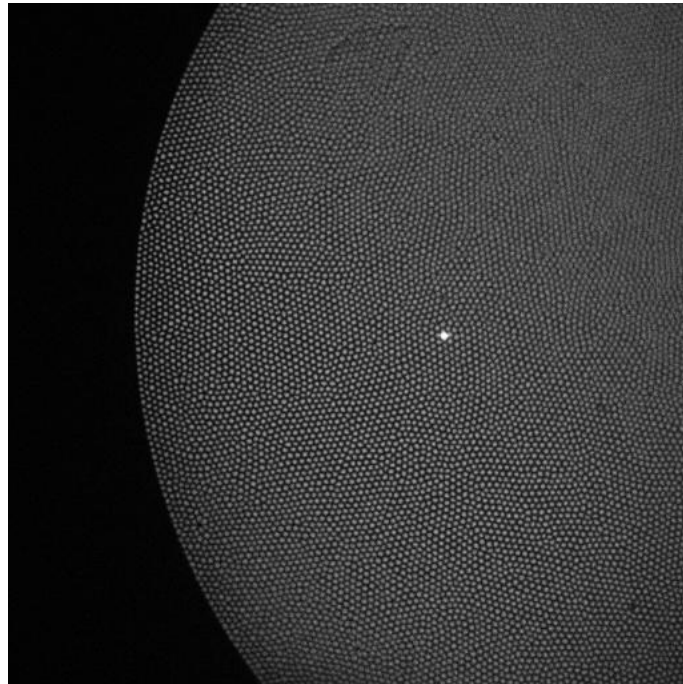


Abbildung 4.5: Das Leuchten einer einzelnen Faser wird erzeugt, indem der Anregungslaser statisch in das Faserbündel eingekoppelt wird und eine IR-Viewer Karte in die Fokusebene des GRIN-Linsen-Objektivs am anderen Ende des Faserbündels gebracht wird.

zung des Pulses. Deshalb muss dem Puls vor dem Eintritt in die Faser eine negative Dispersion aufgeprägt werden, die sich beim Durchlaufen der Faser gerade kompensiert. Dazu wird der Laser, bevor er in das TriM-Scope eingekoppelt wird, in einen Gitterkompressor geleitet. Dieser besteht aus zwei holografischen Reflexionsgittern (Newport, 10HG1200-800-1, gold-coated, 25x25x6 mm) und einem Spiegel. Die Gitter bestehen aus 1200 Strichen/mm und sind genau parallel zueinander ausgerichtet. Durch die Reflexion an den Gittern wird der Laserstrahl spektral aufgespalten. Nach einmaligem Durchlaufen der Gitter wird der Laser am Endspiegel zurückreflektiert. Der Endspiegel wird dabei so einjustiert, dass der Laser mit einem vertikalen Versatz über die Gitter zurückreflektiert wird. Durch den vertikalen Versatz kann der Laser über einen zweiten Umlenkspiegel nun in das TriM-Scope eingekoppelt werden. Aufgrund der spektralen Aufspaltung an den Gittern legen kürzere Wellenlängen einen längeren Weg zurück als längere Wellenlängen. Dies entspricht einer negativen Dispersion. Auf diese Weise kann die positive Dispersion

der optischen Faser kompensiert werden. Die Größe der Dispersion hängt dabei vom Abstand der beiden Reflexionsgitter voneinander ab. Die Justage des Gitterkompressors erfolgte nach dem Prinzip von [Mie, 2008].

Eine Aufbauskitze ist in Abbildung 4.6 abgebildet.

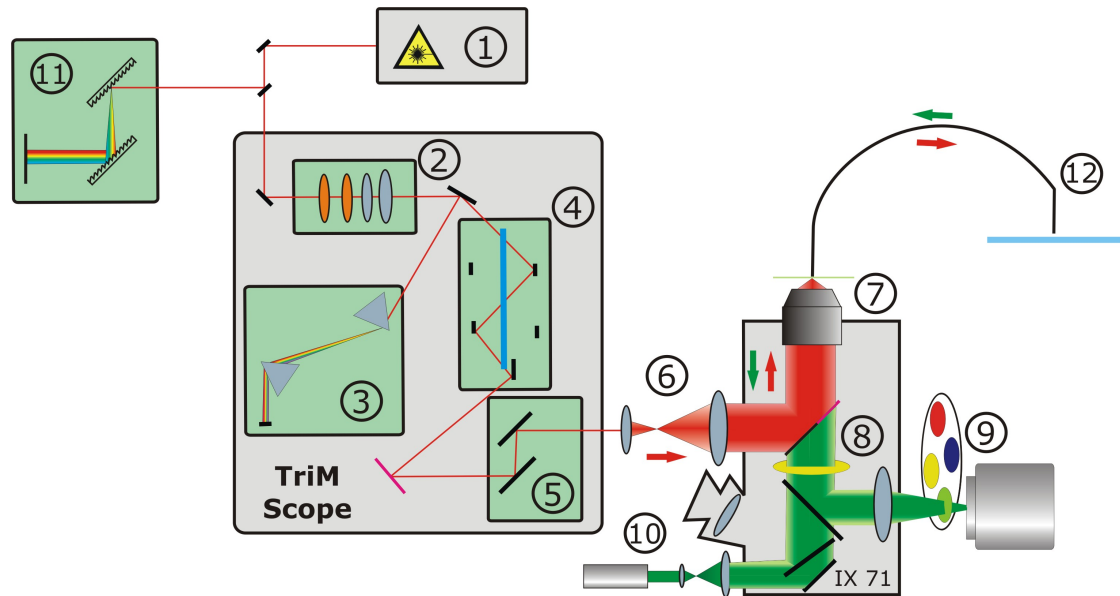


Abbildung 4.6: Aufbau 2-Photonen Laser-Scanning Mikroendoskop: 1) Ti:Sa-Laser; 2) Polarisator und Analysator, Strahlaufweitung; 3) Prismen-Kompressor; 4) Strahl-Vervielfacher; 5) Scanspiegel; 6) Strahl-Aufweitung; 7) Mikroskop-Objektiv; 8) Dichroitischer Spiegel, Kurzpassfilter; 9) Filterrad, EMCCD-Kamera; 10) PMT; 11) Gitterkompressor; 12) optisches Faserbündel mit GRIN-Linsen-Objektiv

5 Bildauswertung

Für die Beurteilung und die Bewertung von Knorpelgewebe werden die Bilder der 2-Photonenmikroskopie ausgewertet. Eine wichtige Charakteristik ist die Morphologie des Gewebes und somit der Bilder. Eine Möglichkeit der Mustererkennung ist die Wavelet-Analyse. In diesem Kapitel sollen die Grundlagen dieser Methode vorgestellt werden.

5.1 Wavelet-Analyse

Die Wavelet-Analyse existiert in ihrer heutigen Form seit Mitte der 80er Jahre. Nachdem sich in den ersten Jahren lediglich eine Handvoll von Wissenschaftlern mit diesem Thema beschäftigt hatten, stieg die Zahl von wissenschaftlichen Artikeln bis weit über tausend im Jahre 2001 an [Add, 2002].

Wavelets sind mathematische Werkzeuge zur hierarchischen Darstellung und Approximation von Funktionen [Bäni, 2002]. Mit ihrer Hilfe können Funktionen als Summe von groben Näherungen und immer feineren Details ausgedrückt werden. Wavelets und deren Anwendungen in der Wavelet-Transformation finden heutzutage in vielen wissenschaftlichen Disziplinen ihre Anwendung. Als Beispiele seien hier die Numerische Mathematik, Computergraphik, Signalverarbeitung, Bildkompression, Mehrträgerübertragungsverfahren, Mustererkennung, Spracherkennung sowie eine ganze Reihe von Filteranwendungen genannt [Cle, 2010].

Die in der Wavelet-Analyse verwendeten Funktionen, *Wavelets* genannt, sind lokale wellenähnliche Funktionen (siehe Abbildung 5.1). Die mathematisch genauere Beschreibung folgt in diesem Kapitel. Eine Wavelet-Transformation ist eine Faltung aus dem Wavelet und dem zu untersuchenden Signal. Mit dem Wavelet werden zwei verschiedene Operationen durchgeführt. Es kann zum einen räumlich verschoben werden und zum anderen kann es gestreckt oder gestaucht werden. Stimmt das Wavelet mit dem untersuchten Signal in seiner Form gut überein, so liefert die Transformation einen hohen Ausgabewert.

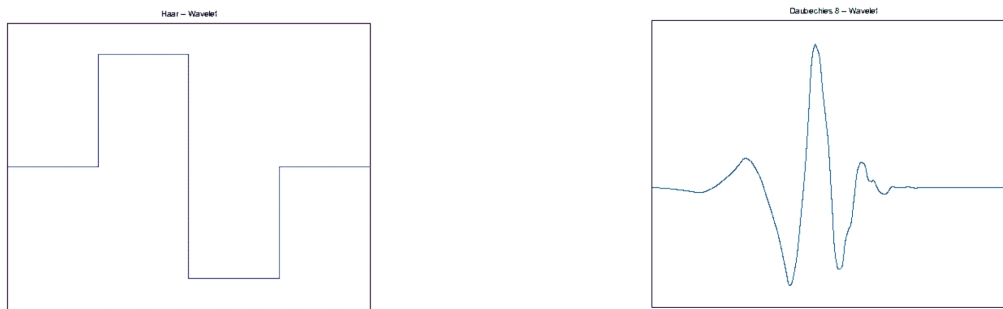


Abbildung 5.1: Wavelet-Funktionen. links: haar-wavelet; rechts: daubechier8-wavelet

Bei einer schlechten Übereinstimmung wird ein kleiner Wert von der Transformation geliefert. Wird die Transformation für diverse Positionen des Signals und verschiedene Skalierungen des Wavelets kontinuierlich durchgeführt spricht man von einer *kontinuierlichen Transformation* (CWT). Werden nur diskrete Stufen verwendet, spricht man von einer *diskreten Transformation* (DWT).

Unter einer Transformation wird, mathematisch gesehen, ein Basiswechsel verstanden, d.h. es wird der gleiche Sachverhalt aus einem anderen Blickwinkel betrachtet. Bei der Transformation geht die Information nicht verloren, sie wird lediglich anders dargestellt [Ess, 2001]. Prominentestes Beispiel einer Transformation ist die Fourier-Transformation. Sie zerlegt ein Signal in Sinus- bzw. Kosinusfunktionen mit unterschiedlichen Frequenzen. Das ursprüngliche Amplituden-Zeit-Signal wird somit in ein Amplituden-Frequenz-Signal umgewandelt.



Abbildung 5.2: Bei der Fourier-Transformation wird ein Signal in Sinus- bzw. Kosinus-Funktionen zerlegt [Mis, 2010]

Der Nachteil einer Fourier-Transformation ist jedoch, dass die Zeitinformation des Si-

gnals verloren geht. Abrupte Signalveränderungen sowie Anfang bzw. Ende eines Ereignisses können durch die Fourier-Analyse nicht detektiert werden. Die *short-time Fourier-Analyse* ist in der Lage, den Zeitpunkt eines Ereignisses zu detektieren, indem das Signal in Zeitfenster aufgeteilt wird. Diese Methode hat jedoch wieder den Nachteil, dass zu Beginn der Analyse die Größe des Zeitfensters festgelegt werden muss, sodass z.B. bei einem kleinen Zeitfenster niedrige Frequenzen gar nicht detektiert werden. Die Wavelet-Analyse kann als Erweiterung der Fourier-Analyse bzw. der *short-time Fourier-Analyse* angesehen werden. Ein Wavelet ist eine Wellenform limitierter Dauer, dessen Mittelwert den Wert Null ergibt. Um ein Signal durch Wavelets darzustellen, muss dieses zum einen skaliert und zum anderen in der Zeit verschoben werden.

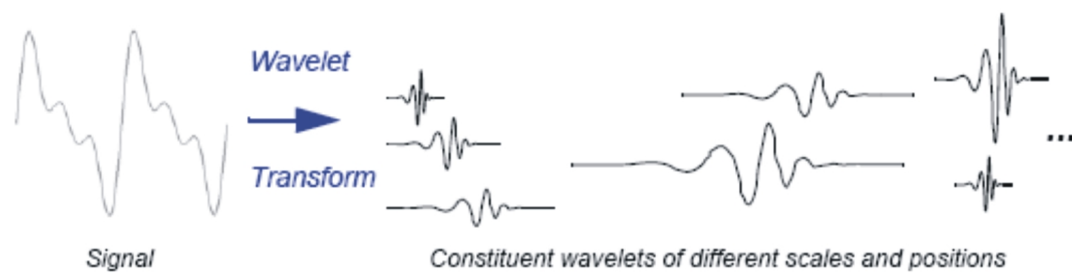


Abbildung 5.3: Bei der Wavelet-Transformation wird ein Signal durch Wavelet-Funktionen approximiert, die verschoben und gestreckt bzw. gestaucht werden können [Mis, 2010]

5.1.1 Mathematische Betrachtung der Wavelet-Analyse

Eine Funktion oder ein Signal kann analysiert werden, indem es auf verschiedenen Skalen (also mit verschiedenen Auflösungen) betrachtet wird. Mit Hilfe von Wavelets ist es möglich, die Differenz von Approximationen auf verschiedenen Skalen darzustellen. Die Approximationen werden durch *Skalierungsfunktionen* geliefert [Bergh, 2007].

Skalierungsfunktion

Die einfachste *Skalierungsfunktion* ist die Haar-Funktion (Abbildung 5.4). Sie ist definiert durch

$$\varphi(t) = \begin{cases} 1 & \text{falls } 0 < t < 1, \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (5.1)$$

Mit dieser Skalierungsfunktion werden stückweise konstante Approximationen erhalten.

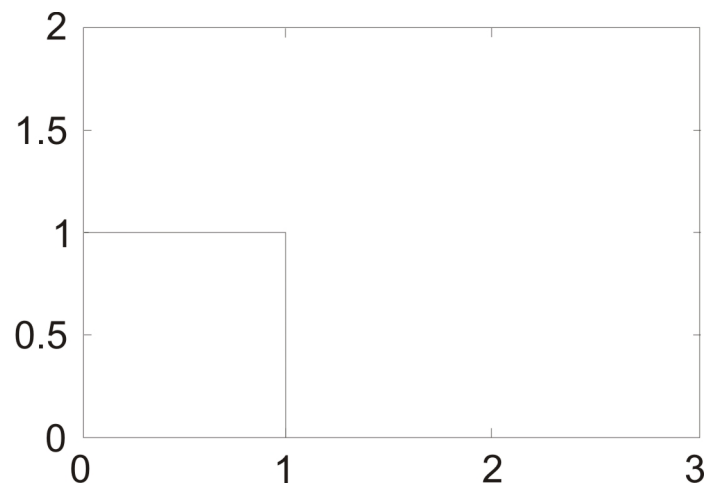


Abbildung 5.4: Haarsche Skalierungsfunktion

Sei f eine beliebige Funktion, so kann sie durch eine Funktion f_1 approximiert werden. Die Approximationsfunktion setzt sich aus den Mittelwerten der Funktion f auf begrenzten Intervallen zusammen (siehe Abbildung 5.5). Die Intervalle auf denen diese Funktion konstant ist, seien $(k/2, (k+1)/2)$. Allgemein kann der Mittelwert \bar{x} einer Funktion auf einem Intervall geschrieben werden als:

$$\bar{x} \cdot (b - a) = \int_a^b f(x) dx \quad (5.2)$$

Für das betrachtete Intervall und die Funktion f erhält man

$$s_{1,k} = 2 \int_{k/2}^{(k+1)/2} f(t) dt \quad (5.3)$$

Da $\varphi(2t - k)$ auf $(k/2, (k + 1)/2)$ gleich 1 und sonst Null ist (vgl. Def. von $\varphi(t)$), lässt sich die Approximation schreiben als

$$f_1(t) = \sum_k s_{1,k} \varphi(2t - k) \quad (5.4)$$

und die Koeffizienten können wie folgt ausgedrückt werden:

$$s_{1,k} = 2 \int_{k/2}^{(k+1)/2} f(t) dt = 2 \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \varphi(2t - k) dt \quad (5.5)$$

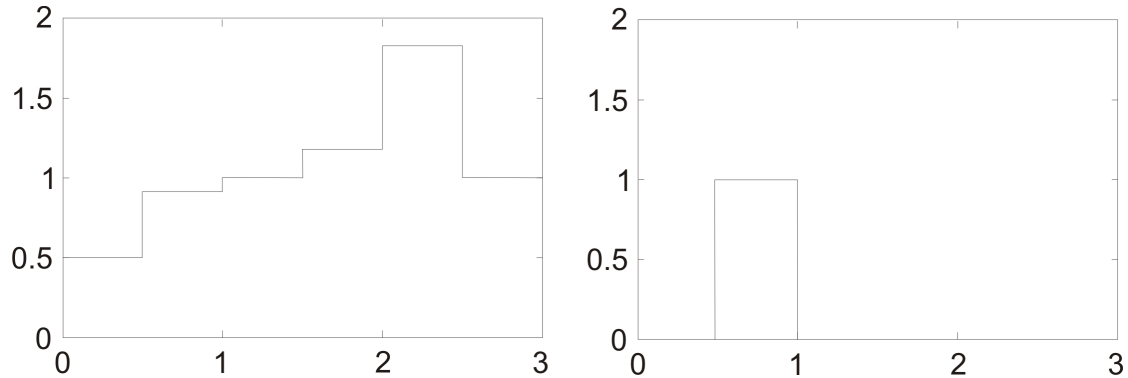


Abbildung 5.5: links: Funktion f_1 mit Mittelwerten einer Funktion f auf den Intervallen $(k/2, (k + 1)/2)$; rechts: Skalierungsfunktion $\varphi(2t - k)$ mit $k = 1$ auf Intervall $(k/2, (k + 1)/2)$

Die Funktion f kann auch auf einer zweimal größeren Skala durch f_0 approximiert werden. Die Intervalle sind $(k, k + 1)$ und man erhält analog zu oben:

$$f_0(t) = \sum_k s_{0,k} \varphi(t - k) \quad (5.6)$$

Die Koeffizienten $s_{0,k}$ sollten nun folgende Bedingung erfüllen:

$$s_{0,k} = \frac{1}{2}(s_{1,2k} + s_{1,2k+1}) \quad (5.7)$$

Was hier nun an einem Beispiel mit der Haar-Skalierungsfunktion gezeigt wurde, kann allgemein wie folgt formuliert werden. Eine Funktion f kann durch stückweise konstante Funktionen auf den Intervallen $(2^{-j}k, 2^{-j}(k + 1))$ approximiert werden:

$$f_j(t) = \sum_k s_{j,k} \varphi_{j,k}(t) \quad (5.8)$$

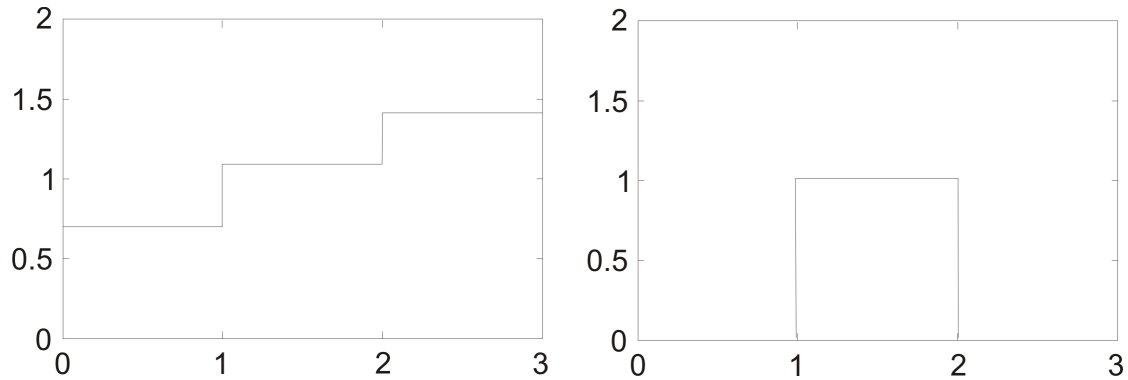


Abbildung 5.6: links: Funktion f_0 mit Mittelwerten der Funktion f_1 auf den Intervallen $(k, k+1)$; rechts: Skalierungsfunktion $\varphi(t-k)$ mit $k=1$ auf Intervall $(k, k+1)$

mit $\varphi_{j,k}(t) = 2^{j/2}\varphi(2^j t - k)$, einer gestreckten, verschobenen und normalisierten Skalierungsfunktion.

Wavelets

Wie gerade beschrieben, kann eine Funktion f auf unterschiedlichen Auflösungsebenen approximiert werden, wobei die Approximation f_1 mehr Details enthält als die Approximation f_0 . Die Differenz dieser beiden Funktionen sei

$$d_0 = f_1 - f_0. \quad (5.9)$$

Die Funktion d_0 ist ebenso wie f_1 stückweise konstant auf dem Intervall $(k/2, (k+1)/2)$.

Auf dem Intervall $(k, k+1)$ werde der Wert von d_0 im Bereich von k bis $k+1/2$ mit $w_{0,k}$ und der Wert im Bereich $k+1/2$ bis $k+1$ als $-w_{0,k}$ bezeichnet. Beide Werte messen die Abweichung der Funktion f_1 von ihrem Mittelwert, also der Funktion f_0 . Dies ist aus Abbildung 5.7 ersichtlich.

$$w_{0,k} = \frac{1}{2}(s_{1,2k} - s_{1,2k+1}) \quad (5.10)$$

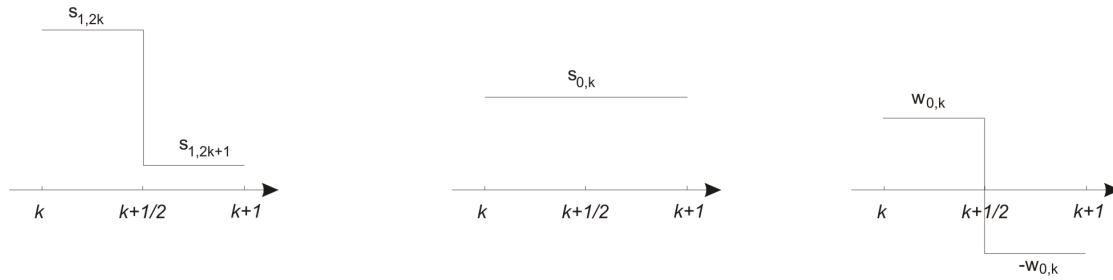


Abbildung 5.7: Für ein Intervall sind zwei Approximationsfunktionen auf unterschiedlichen Skalen und auf der rechten Seite deren Differenz dargestellt.

Nun kann das Haar-Wavelet definiert werden als:

$$\psi(t) = \begin{cases} 1 & \text{falls } 0 < t < 1/2 \\ -1 & \text{falls } 1/2 < t < 1 \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (5.11)$$

Analog zur bisherigen Vorgehensweise kann d_0 ausgedrückt werden durch:

$$d_0(t) = \sum_k w_{0,k} \psi(t - k) \quad (5.12)$$

wobei $w_{0,k}$ den *Wavelet-Koeffizienten* darstellt. Die gestreckten und verschobenen Wavelets sind definiert durch (vergleiche mit der Skalierungsfunktion):

$$\psi_{j,k}(t) = 2^{j/2} \psi(2^j t - k) \quad (5.13)$$

Eine Funktion f kann somit in eine Wavelet-Zerlegung überführt werden:

$$f(t) = \sum_{j,k} w_{j,k} \psi_{j,k}(t) \quad (5.14)$$

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass ein Signal durch Mittelwertbildung approximiert werden kann. Zwei benachbarte Skalierungskoeffizienten werden auf einer tieferen Auflösungsebene abermals durch ihren Mittelwert approximiert. Die dabei verloren gegangene Information wird als Differenz berechnet und gespeichert.

Eigenschaften von Wavelets

Eine Wavelet-Funktion erfüllt die folgenden mathematischen Kriterien [Add, 2002].

1. Ein Wavelet muss eine endliche Energie besitzen:

$$E = \int_{-\infty}^{\infty} |\psi(t)|^2 dt < \infty \quad (5.15)$$

2. Für die Fourier-Transformierte $\hat{\psi}(f)$ eines Wavelets $\psi(t)$

$$\hat{\psi}(f) = \int_{-\infty}^{\infty} \psi(t) e^{-i(2\pi f)t} dt \quad (5.16)$$

muss folgende Bedingung erfüllt sein

$$C_g = \int_0^{\infty} \frac{|\hat{\psi}(f)|^2}{f} df < \infty \quad (5.17)$$

Diese Bedingung impliziert, dass das Wavelet den Mittelwert Null hat. Diese Bedingung wird auch *Auslöschungsforderung* genannt.

3. Die Fourier-Transformierte eines komplexen Wavelets muss real sein und für negative Frequenzen verschwinden.

2-Dimensionale Wavelet-Analyse

Grauskalenbilder lassen sich als Funktionen zweier Variablen darstellen. Die vorgestellte Wavelet-Analyse muss somit auf eine weitere Dimension erweitert werden. Die Funktion, die ein Graustufenbild beschreibt sei $f_1(x, y)$ und auf den Quadraten $k_x/2 < x < (k_x + 1)/2, k_y/2 < y < (k_y + 1)/2$ stückweise konstant und habe die Werte $s_{1,k}$. Diese Werte entsprechen somit den Pixelwerten eines Graustufenbildes und das betrachtete Quadrat den Ausdehnungen eines Pixels. Als Erweiterung zur eindimensionalen Wavelet-Analyse wird nicht nur der Mittelwert zweier benachbarter Intervalle verwendet, sondern es werden 4 benachbarte Pixel durch ihren Mittelwert approximiert [Bergh, 2007]

$$s_{0,k} = \frac{1}{4}(s_{1,2k} + s_{1,2k+e_x} + s_{1,2k+e_y} + s_{1,2k+e}) \quad (5.18)$$

mit $e_x = (1, 0)$, $e_y = (0, 1)$ und $e = (1, 1)$. Dies ist auch in Abbildung 5.8 zu sehen.

Die Funktion f_1 wird somit durch eine Funktion f_0 approximiert, die auf den Intervallen $k_x < x < k_x + 1, k_y < y < k_y + 1$ stückweise konstant ist. Analog zu vorher, werden auch hier Differenzen berechnet. Für das Haar-System sind dies:

$$w_{0,k}^H = \frac{1}{4}(s_{1,2k} + s_{1,2k+e_x} - s_{1,2k+e_y} - s_{1,2k+e}) \quad (5.19)$$

$$w_{0,k}^V = \frac{1}{4}(s_{1,2k} - s_{1,2k+e_x} + s_{1,2k+e_y} - s_{1,2k+e}) \quad (5.20)$$

$$w_{0,k}^D = \frac{1}{4}(s_{1,2k} - s_{1,2k+e_x} - s_{1,2k+e_y} + s_{1,2k+e}) \quad (5.21)$$

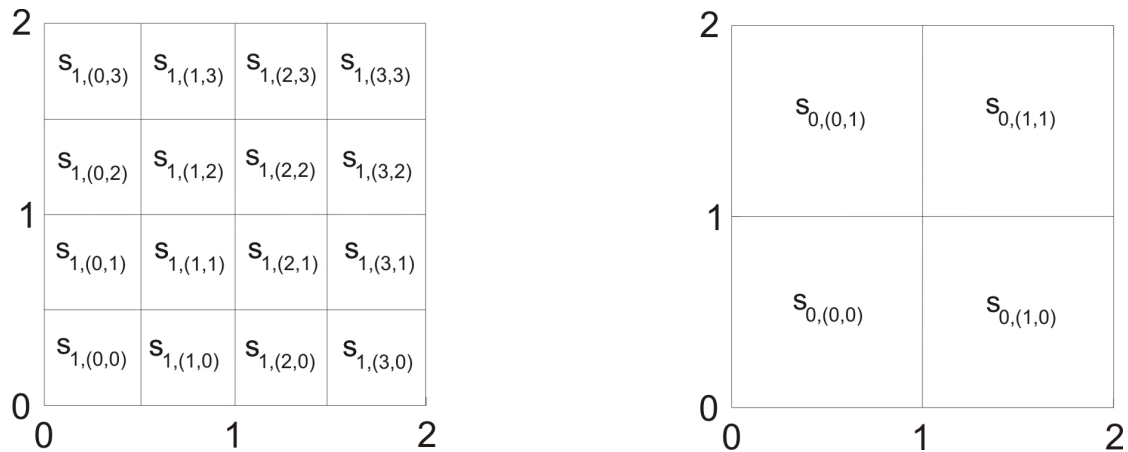


Abbildung 5.8: links: 2-dimensionales Bild mit den jeweiligen Pixelwerten; rechts: Mittelwerte von 4 benachbarten Pixeln

Die oberen Indizes stehen für *horizontal*, *vertikal* und *diagonal*. Die Koeffizienten können als Differenzen in den jeweiligen Richtungen angesehen werden. Sie sind in der Lage, Kanten in den jeweiligen Richtungen zu detektieren. Das Originalbild in 5.9 besteht aus einem Quadrat. Die Bilder der Detailkoeffizienten verdeutlichen, dass sie Kanten in der jeweiligen Richtung darstellen. So sind z.B. im Bild der horizontalen Detailkoeffizienten lediglich die horizontalen Linien des Quadrats zu erkennen. Die diagonalen Koeffizienten erkennen nur die Kanten des Quadrats da dies die einzigen Gebiete des Bildes sind, in dem sich diagonale Linien befinden auch wenn diese sehr kurz sind.

Anstelle von der aufwändigen Berechnung aller möglichen Skalen (kontinuierliche Wavelet-Transformation) beschränkt man sich bei der *diskreten Wavelet-Transformation* auf die Skalen bzw. Positionen, die auf der Zweierpotenz aufbauen. Die Analyse wird so deutlich effizienter und ist annähernd genauso exakt.

Die niedrigen Frequenzen bestimmen normalerweise ein Signal. Hohe Frequenzen bilden lediglich Nuancen bzw. Feinheiten. Ein Signal kann somit in seine *Approximation* und *Details* aufgeteilt werden. Die Approximation beinhaltet die niedrigen Frequenzen eines Signals und bildet somit das „Grundgerüst“, die Details beinhalten die hohen Frequenzen. Diese Zerlegung kann iterativ wiederholt werden (multilevel Zerlegung). Mathematisch kann die Zerlegung des Signals f wie folgt dargestellt werden:

$$f(x) = \sum_{(j,k)} d_j(k) \psi_{j,k}(x) \quad (5.22)$$

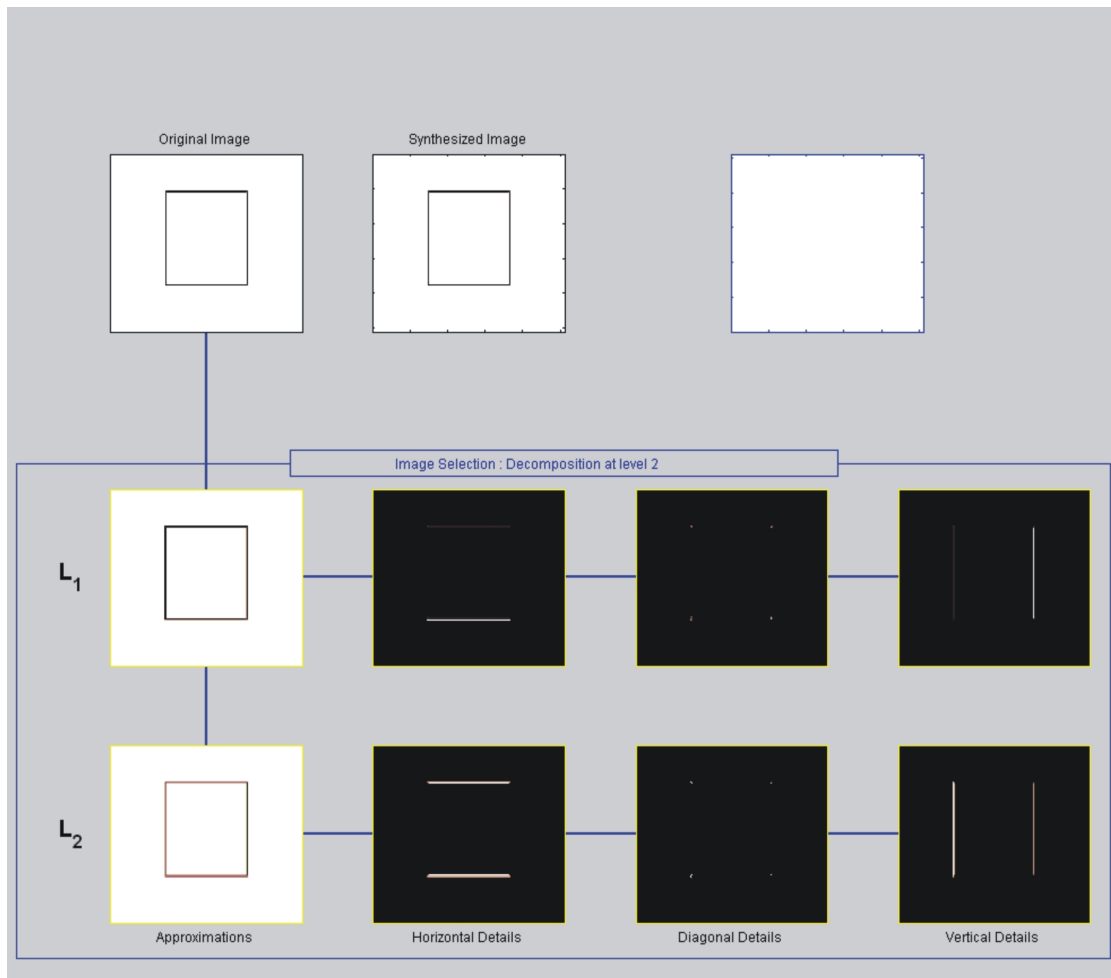


Abbildung 5.9: 2-dimensionale Wavelet-Analyse auf zwei Ebenen (L_1 und L_2). Links oben ist das Originalbild zu sehen. Darunter sind die beiden Approximationen L_1 und L_2 abgebildet. Davon abzweigend sind die jeweiligen drei Detailkoeffizienten abgebildet (horizontal, vertikal, diagonal).

mit

$$\psi_{j,k}(x) = 2^{j/2} \psi(2^j x - k) \quad (5.23)$$

wobei j die Dilatationen bzw. Skalierung und k die Translation bzw. Verschiebung des Wavelets angibt. $d_j(k)$ sind die sogenannten Wavelet-Koeffizienten.

5.2 Methoden zur Dimensionsreduzierung

Mit der gerade beschriebenen Wavelet-Analyse lassen sich mehrdimensionale Datensätze des zu untersuchenden Signals oder Bildes erzeugen. Die Interpretation eines mehrdimensionalen Datensatzes erfordert oft eine Reduzierung auf zwei oder drei Dimensionen. Zwei dieser Methoden sind die Hauptkomponentenanalyse (PCA, principal component analyse) und die Selbstorganisierende Karten (SOM, self-organising maps).

5.2.1 Selbstorganisierende Karten

SOMs bezeichnen eine Art von künstlichen neuronalen Netzwerken die sich selbst organisieren. Die Methode der SOM wurde zuerst in [Koh, 1982] formuliert.

Das Ziel des SOM-Algorithmus ist die Zuordnung eines abstrakten N -dimensionalen Eingaberaums $X \subset \mathbb{R}^N$ in einen Satz von Neuronen A in einem niedrig-dimensionalen Raum $M \subset \mathbb{R}^M$ [Koh, 2001] (typischerweise ist $M = 1$ oder $M = 2$). Die Zuordnung sollte sich zum einen komplett selbst-organisieren und zum anderen sollte die resultierende Karte topologisch geordnet sein. Es sollen sich also die Eigenschaften der Daten des Eingaberaums X im Ausgaberaum M widerspiegeln [Ont, 2008].

Eine SOM wird gemäß den folgenden drei Schritten gebildet:

1. Die Neuronen A werden an den Knoten eines Gitters L im Ausgaberaum M platziert. Dabei werden meistens rechteckige Gitterstrukturen verwendet.
2. Jedem Neuron $a \in A$ wird ein Referenzvektor $w_a \in \mathbb{R}^N$ zugeordnet. Dieser Referenzvektor vernetzt ein Neuron aus dem Gitter mit dem Eingaberaum N . Innerhalb des Ausgaberaums gibt es keine Verbindung zwischen den Neuronen.
3. Während der Lernphase wird die Verteilung der Referenzvektoren w_a iterativ durch eine Sequenz aus Trainingsvektoren $x_t \in X$ angepasst. Zunächst wird das Neuron ermittelt, dessen Referenzvektor w_a den kleinsten Abstand zum Eingangsneuron x besitzt. Die Distanz zwischen dem Eingabeneuron und den Referenzvektoren wird meistens über die Euklidische Distanz ermittelt. Für dieses Neuron a^* , auch *Siegerneuron* genannt, gilt:

$$a^* = \operatorname{argmin}_a \|w_a - x\| \quad (5.24)$$

Nachdem das Siegerneuron ermittelt wurde, werden die Referenzvektoren gemäß

einer Gewichtungsfunktion näher zum Eingangsneuron verschoben.

$$\Delta w_a = \epsilon(t)h(a, a^*)(x - w_a) \quad (5.25)$$

wobei $h(a, a^*)$ eine Funktion ist, die um das Siegerneuron zentriert ist um mit steigender Distanz $d_M(a, a^*)$ zu diesem Neuron in dem von den Neuronen aufgespannten Gitter abfällt. Es werden also die benachbarten Neuronen des Siegerneurons nicht mehr so stark gewichtet, erfahren aber dennoch einen Einfluss. Das Siegerneuron wird am weitesten in Richtung des Eingabeneurons hin verschoben, die benachbarten Neuronen folgen mit einer geringeren Gewichtung.

Ein Beispiel für eine Funktion $h(a, a^*)$ ist

$$h(a, a^*) = \exp\left(-\frac{d_M^2(a, a^*)}{2\sigma^2(t)}\right) \quad (5.26)$$

Diese Funktion hat die Form einer Gauß-Glocke wobei $\sigma(t)$ ein spezifischer Radius um das Siegerneuron herum ist. Das Verhalten der SOM beim Trainingsprozess ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

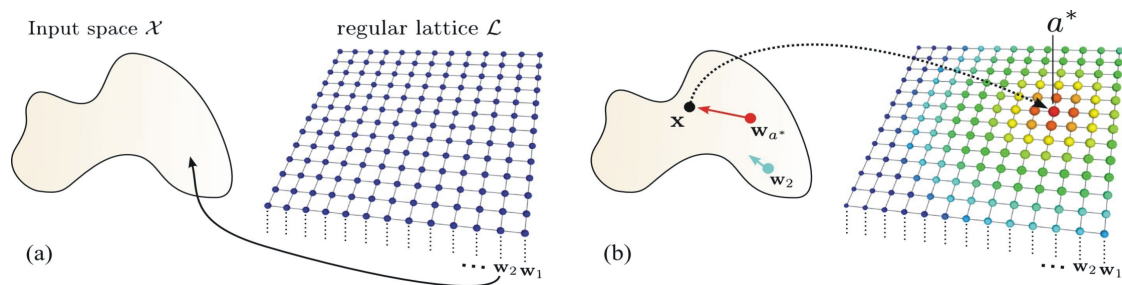


Abbildung 5.10: SOM Algorithmus. a) rechteckig angeordnetes Gitter mit Neuronen an den Gitterpunkten. Die Referenzvektoren sind mit den Eingangsneuronen vernetzt. b) Zum Eingangsneuron x wurde ein Siegerneuron w_{a^*} ermittelt. Gemäß der Gewichtungsfunktion werden das Siegerneuron und die Nachbarneuronen zum Eingangsneuron hin verschoben [Ont, 2008]

Während der Trainingsphase der SOM wird der Radius $\sigma(t)$ der Gewichtungsfunktion sowie die Schrittweite $\epsilon(t)$ kontinuierlich verkleinert. Für gewöhnlich nehmen diese beiden Funktionen exponentiell mit t ab. Dies hat zur Folge, dass sich die SOM nach einer zunächst groben Ausrichtung immer feiner an die Eingabedaten anpasst.

5.2.2 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wird auch häufig in der Clusteranalyse und zur Reduzierung der Dimension des Parameterraums verwendet, insbesondere dann, wenn es noch keinerlei Vorstellung (Modell) von der Struktur der Daten gibt. Dabei wird ausgenutzt, dass die PCA das (orthogonale) Koordinatensystem so dreht, dass die Kovarianzmatrix diagonalisiert wird. Außerdem sortiert die PCA die Reihenfolge der Koordinatenachsen (die Hauptkomponenten) so um, dass die erste Hauptkomponente den größten Anteil der Gesamtstreuung (Varianz) im Datensatz enthält, die zweite Hauptkomponente den zweitgrößten Anteil, usw. (siehe Abb. 5.11). Wie an den Beispielen im vorherigen Abschnitt illustriert wurde, können die hinteren Hauptkomponenten (also diejenigen, welche nur einen geringen Anteil an der Gesamtstreuung enthalten) ersatzlos gestrichen werden, ohne dass dadurch ein nennenswerter Informationsverlust entsteht.

Die PCA dient als Methode zur Reduzierung der Dimension eines Parameterraums [Bis, 2000]. Sie ist eine lineare Transformation von einem D -dimensionalen Raum in einen d -dimensionalen Raum, wobei $d < D$. Ein Eingabevektor $x \in \mathbb{R}^D$ kann als Linearkombination von D orthonormalen Vektoren $\{\mathbf{m}\}_D$ dargestellt werden [Var, 2006]:

$$x = \sum_{j=1}^D z_j \mathbf{m}_j \quad (5.27)$$

Die Koeffizienten z_j können explizit ausgedrückt werden durch

$$z_j = \mathbf{m}_j^T x \quad (5.28)$$

Um den Vektor x zu nähern, wird nur die Untermenge $d < D$ der Basisvektoren $\{\mathbf{m}\}_D$ behalten, sodass nur noch d Koeffizienten $\{z\}_d$ verwendet werden. Die verbleibenden Koeffizienten werden durch eine Konstante ersetzt $\{b\}_{(D-d)}$

$$\tilde{x} = \sum_{j=1}^d z_j \mathbf{m}_j + \sum_{j=d+1}^D b_j \mathbf{m}_j = \mathbf{z} + \sum_{j=d+1}^D b_j \mathbf{m}_j \quad (5.29)$$

Der Vektor \tilde{x} stellt somit eine Approximation in der reduzierten Dimension d dar. Der Fehler, der bei der Reduzierung der Dimensionen eingeführt wurde, ist

$$x - \tilde{x} = \sum_{j=d+1}^D (z_j - b_j) \mathbf{m}_j \quad (5.30)$$

Ziel ist es, den Vektor x bestmöglich durch z zu approximieren. Dazu müssen die entsprechenden Parameter für die Basisvektoren \mathbf{m} und die Koeffizienten b gefunden werden.

Die beste Approximation wird erreicht, wenn das Quadrat der Fehler über den gesamten Datensatz sein Minimum erreicht

$$E_d = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^v \|x_n - \tilde{x}_n\|^2 = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^v \sum_{j=d+1}^D (z_j^n - b_j)^2 \quad (5.31)$$

Das Minimum ergibt sich, wenn die erste Ableitung von E_d nach b_j Null ergibt und man erhält:

$$b_j = \frac{1}{v} \sum_{n=1}^v z_j^n = \mathbf{m}_j^T \bar{x} \quad (5.32)$$

mit

$$\bar{x} = \frac{1}{v} \sum_{i=1}^v x_i. \quad (5.33)$$

E_d kann nun wie folgt ausgedrückt werden:

$$\frac{1}{2} \sum_{j=d+1}^D \sum_{i=1}^v \{\mathbf{m}_j^T (x_i - \bar{x})\}^2 = \frac{1}{2} \sum_{j=d+1}^D \mathbf{m}_j^T \Sigma \mathbf{m}_j \quad (5.34)$$

wobei Σ die Kovarianzmatrix ist und gegeben ist durch

$$\Sigma = \sum_{i=1}^v (x_i - \bar{x})(x_i - \bar{x})^T. \quad (5.35)$$

E_d hat ein Minimum, wenn die Basisvektoren die Gleichung

$$\Sigma \mathbf{m}_j = \lambda_j \mathbf{m}_j \quad (5.36)$$

erfüllen. Die Basisvektoren müssen also Eigenvektoren der Kovarianzmatrix sein.

Die Grundannahme für die Verwendung der PCA zur Clusteranalyse und Dimensionsreduktion lautet: Die Richtungen mit der größten Streuung (Varianz) beinhalten die meiste Information.

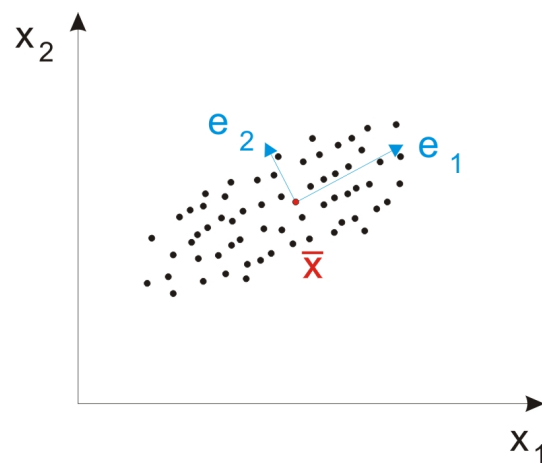


Abbildung 5.11: Schematische Darstellung eines 2-dimensionalen Datensatzes mit den Hauptkomponenten e_1 und e_2 . Die Richtungen dieser Eigenvektoren sind diejenigen mit der größten Varianz des Clusters an Datenpunkten. Die eindimensionale Projektion des Datensatzes wird dadurch erreicht, dass zunächst der Mittelwert \bar{x} subtrahiert wird und danach auf e_1 projiziert wird.

6 Ergebnisse

6.1 Lokalisierte Photoaktivierung

Die in Kapitel 4 vorgestellten Versuchsaufbauten sind für multiple Anwendungen geeignet. Eine mit dem multifokalen non-descanned Detektionsmodus durchgeführte Anwendung war die lokalisierte Photoaktivierung an Protoplasten der Tabak-Pflanze.

Die konventionelle Laser-Scanning Mikroskopie kann dazu genutzt werden, um intrazelluläre Proteindynamik in einem stationären Zustand zu erfassen. Dazu wird ein Fluorophor kovalent an das zu untersuchende Protein gebunden. Der so generierte Komplex kann nun aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Fluorophors mittels LSM intrazellulär detektiert werden. Die Untersuchung von real-time Proteindynamiken erfordert eine Kombination aus einer schnellen, hochauflösenden Mikroskopietechnik und einer spezifischen, lokal definierten Markierung [Marti, 2007b]. Die spezifisch lokalisierte Markierung kann durch ein spezielles Fluoreszenzmolekül, dem photoaktivierbaren, grün-fluoreszierenden Protein (pa-GFP) in Verbindung mit einer 2-Photonenaktivierung erfüllt werden. Befindet sich das pa-GFP Molekül in einem nicht angeregten Zustand, so ist die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm sehr gering und kaum zu detektieren. Wird das Molekül jedoch mit Laserlicht der Wellenlänge 408nm (1-Photon) bzw. 780-840 nm (2-Photon) aktiviert [Post, 2005], so steigt die Fluoreszenzintensität bei Anregung um das 100-fache an [Pat, 2002]. Die Aktivierung des Fluorophors ist aufgrund der 2-Photonen-Absorption auf das sehr kleine Fokusvolumen begrenzt. Da auch die Eindringtiefe des nahinfraroten Lasers hoch ist, kann das pa-GFP Molekül innerhalb einer gesamten Zelle selektiv aktiviert werden. Auch die Zellschädigung und Photobleaching sind in diesem Spektralbereich minimiert. Um die real-time Proteindynamik erfassen zu können, muss das aktivierte pa-GFP Molekül zeitaufgelöst mittels 1-Photon- oder 2-Photon-Mikroskopie angeregt und visualisiert werden. Wird das pa-GFP in einem definierten Volumen innerhalb der Zelle z.B. dem Zellkern aktiviert, so kann die Dynamik der gelabelten Proteine aus diesem Volumen heraus beobachtet und

gemessen werden.

Im Zellkern sind genomische DNA mit Histonen und anderen Proteinen zum sogenannten Chromatin organisiert. Die Chromatinstruktur ist hochdynamisch und wird unter anderem durch high mobility group (HMG) Proteine moduliert. Das *Arabidopsis* Genom kodiert sieben verschiedene Typen von HMGB Proteinen, die sich in Struktur, Expressionsmuster und DNA-Bindungseigenschaften unterscheiden. Obwohl das HMGB1 Protein in Säugetierzellen nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma sowie außerhalb der Zellen detektiert wurde [Mül, 2004], [Yang, 2010], konnte in Pflanzen bisher noch kein HMGB Protein außerhalb des Zellkerns gefunden werden. Eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation von GFP-markierten HMGB2/3 und HMGB4 Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte jedoch, dass trotz dominierender Lokalisation im Zellkern sich auch Anteile der Proteine im Zytoplasma aufhalten [Ped, 2010]. Die lokalisierte Photoaktivierung mittels pa-GFP konnte dazu genutzt werden, um einen Transfer dieser Proteine zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma zu testen. Als System für diese Untersuchungen wurden Tabak-Protoplasten verwendet.

6.1.1 Messmethode

Die Messung des Transfers der HMGB-Proteine lässt sich in zwei Arbeitsschritte gliedern.

1. Auffinden transfizierter Protoplasten

Bei der Transfektion der Tabak-Protoplasten kann nur eine begrenzte Transfektionseffizienz erzielt werden. Aus diesem Grund ist es notwendig, zunächst erfolgreich transfizierte Zellen ausfindig zu machen. Dazu wurde eine Co-Transfektion von *prenylated Rab acceptor 1* (Pra1; At2g38360), einem Membran-lokalisierten Protein welches sich in Spots um den Zellkern herum angeordnet ist, mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff (Ds-Red) durchgeführt. Um den Fluoreszenzfarbstoff separieren zu können, wurde ein TRITC-Filtersatz verwendet. Dieser besteht aus zwei Bandpassfiltern. Mit dem ersten Filter 543/22 wird aus dem Spektrum der Mikroskoplampe ein Wellenlängenbereich zur Beleuchtung der Probe ausgeschnitten. Die Detektion erfolgte über einen 593/40 Filter, sodass nur Fluoreszenzlicht aus diesem Spektralbereich den Detektor erreichen konnte. In Abbildung 6.1 ist die Punktstruktur des gelabelten Proteins Pra1 gut erkennbar und mit Hilfe des Durchlichtbildes lokalisierbar.

2. Aktivierung und Anregung des paGFP

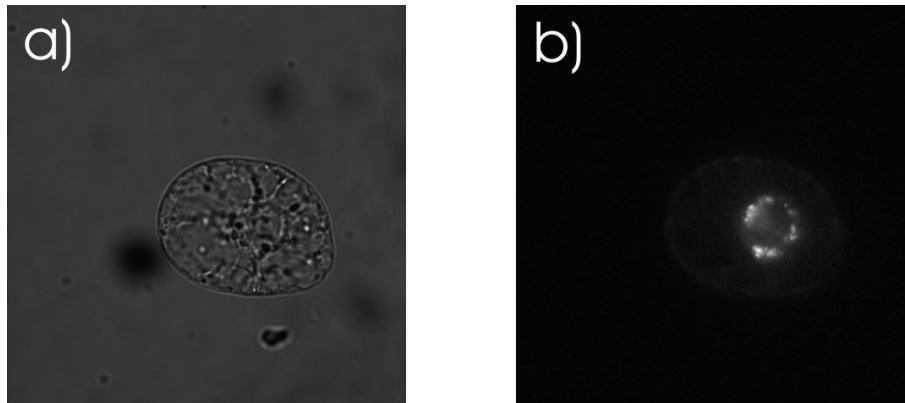


Abbildung 6.1: a) Hellfeld-Aufnahme eines Tabak-Protoplasten, b) Fluoreszenzaufnahme mit TRITC-Filtersatz; Ds-Red markiertes Pra1 ist in Punkten um den Zellkern herum angeordnet.

An einem erfolgreich transfizierten Protoplast konnte nun die Aktivierung und Anregung des paGFP durchgeführt werden. Dazu wurde das Scanfeld des Ti:Sa-Lasers bei einer Wellenlänge von 820 nm auf die zu bestrahlende Fläche angepasst und positioniert. Da gleichzeitig zur Aktivierung auch die Anregung mittels 1-Photon-Absorption stattfinden kann, wurde der TRITC-Filtersatz durch einen GFP-Filtersatz ausgetauscht. Dieser besitzt einen 470/40 Anregungsfilter und einen 525/50 Emissionsfilter. Als Lichtquelle diente wieder die Mikroskop-Durchlichtlampe.

6.1.2 Ergebnisse

Mittels der lokalisierten Photoaktivierung sollten die Transportvorgänge von HMGB2/3 und HMGB4 in BY-Protoplasten untersucht werden. Vor allem sollte gezeigt werden, ob es einen Transfer zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma und umgekehrt gibt. Das paGFP musste dementsprechend zum einen im Zellkern sowie in einer zweiten Messung im Zytoplasma aktiviert werden. Die Aktivierung wurde jeweils über 300 s aufrecht erhalten. Das aktivierte Areal sowie der Zellkern des Protoplasten sind jeweils auf den Bildern in Abbildung 6.2 eingezeichnet. Die dargestellten Bilder sind in einem Abstand von 50 Sekunden aufgenommen worden. In Abbildung 6.3 sind die Intensitätsverläufe in verschiedenen Regionen der Zelle dargestellt. Die einzelnen Regionen sind aus Abb. 6.2 ersichtlich. Die Aktivierungszone ist die Region, in der mit dem Ti:Sa-Laser das pa-GFP

Molekül aktiviert wird.

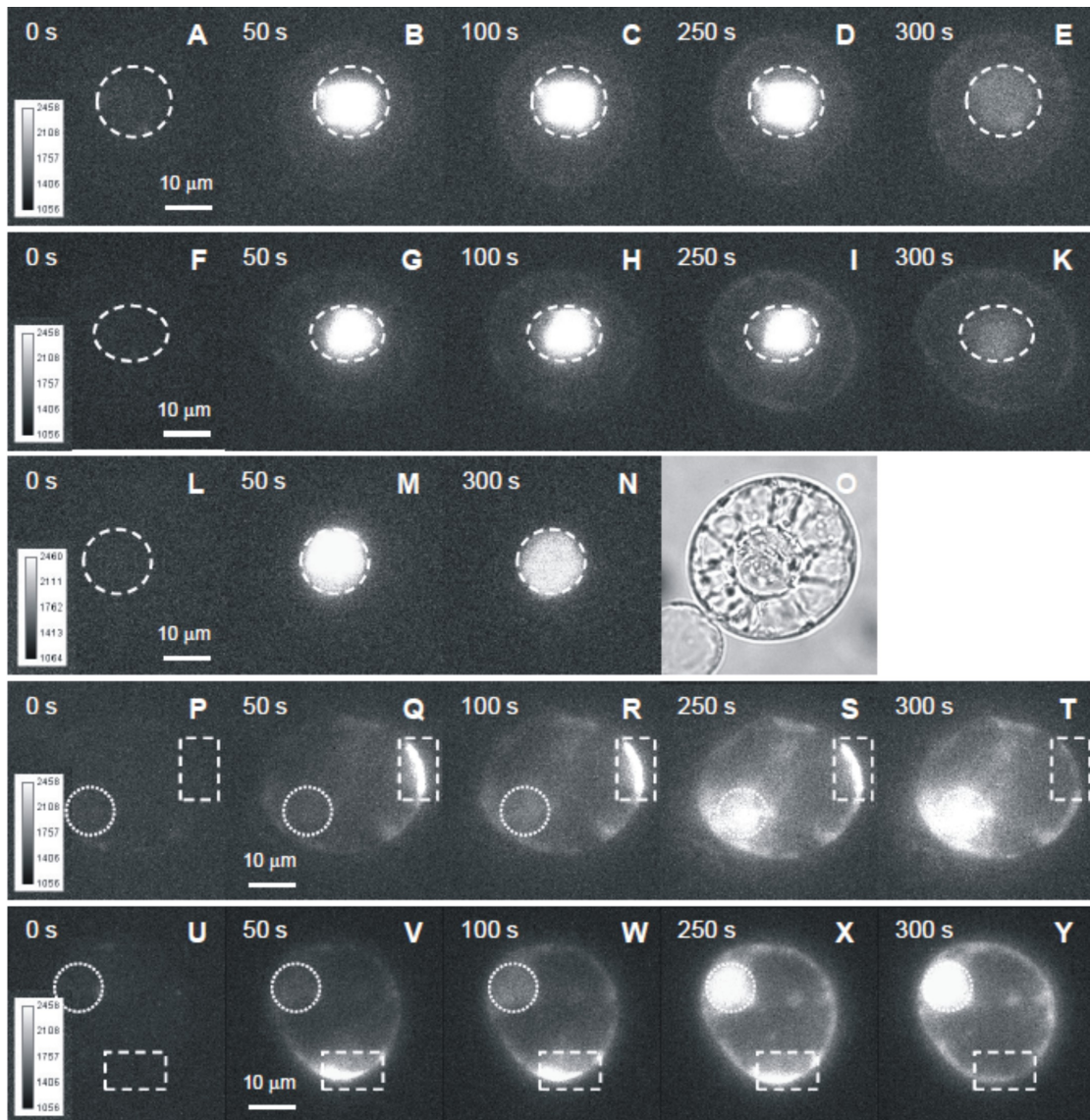


Abbildung 6.2: BY-Protoplasten paGFP-HMGB2(A-E) Aktivierung Kern; paGFP-HMGB4 (F-K) Aktivierung Kern; paGFP-HMGB1 (L-N) Aktivierung Kern und Hellfeld (O); paGFP-HMGB2 (P-T) Aktivierung Zytosol; paGFP-HMGB4 (U-Y) Aktivierung Zytosol. In P-Y sind die Zellkerne sowie die Aktivierungsareale eingezeichnet (aus [Ped, 2010]).

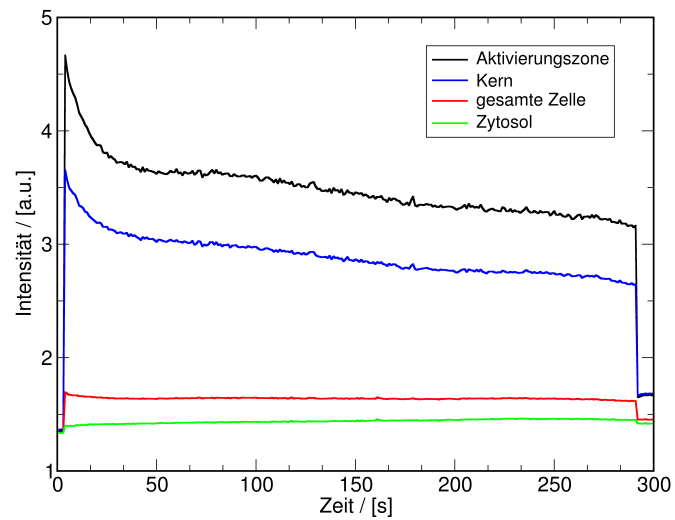
Die Aktivierung im Kern erzielt bei den Proteinen HMGB2/3 und HMGB4 ähnliche Zeitverläufe. Mit dem Einschalten des Lasers steigt die Intensität im Kern sowie in der

Aktivierungszone sprunghaft auf einen Maximalwert an, um im folgenden Zeitverlauf exponentiell abzufallen. Dieser exponentielle Abfall ist zum einen auf den Prozess des Photobleaching sowie zum anderen auf die Diffusion aktivierter Moleküle aus dem Kern heraus, zurückzuführen. Die Fluoreszenzintensität im Zytosol ist über den gesamten Zeitverlauf gegenüber der Intensität im Kern sehr gering. Es ist jedoch ein geringer Intensitätszuwachs mit der Zeit festzustellen, was anhand der dargestellten Bilder in Abb. 6.2 auch zu erkennen ist. Dieser Zuwachs an Intensität ist auf den Transport von aktivierten Fluoreszenzmolekülen aus dem Kern heraus zurückzuführen. Über die gesamte Zelle integriert, bleibt die Intensität annähernd konstant. Bleaching- und Aktivierungsrate sind somit annähernd identisch.

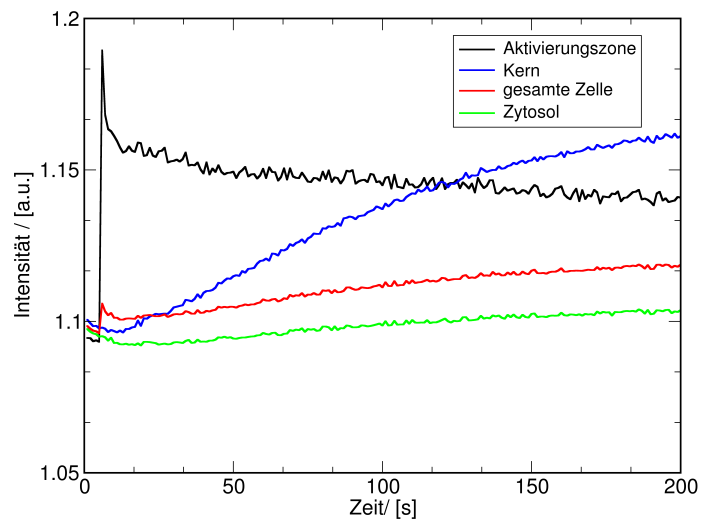
Bei der Lage der Aktivierungszone im Zytosol sieht der Verlauf der Intensitäten in den einzelnen Regionen deutlich unterschiedlich aus. In der Aktivierungszone lässt sich zunächst ein qualitativ gleicher Zeitverlauf wie bei der Aktivierung im Kern feststellen. Die Intensität steigt mit dem Anschalten des Lasers sprunghaft auf seinen Maximalwert an und nimmt anschließend exponentiell ab. Auch hier sind die gleichen Mechanismen, Bleaching und Diffusion, für die Abnahme des Signals verantwortlich. Ganz anders ist der Zeitverlauf im Zellkern. Hier ist ein kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität feststellbar. Die Steigung nimmt mit fortschreitender Messdauer ab. Auch im Zytosol sowie in der gesamten Zelle nimmt die Fluoreszenzintensität leicht zu. Aus dem Aktivierungsvolumen im Zytosol werden die Fluoreszenzmoleküle in das umliegende Zytosol transportiert. Von dort wird ein Großteil in den Zellkern transportiert. Da sich im Gegensatz zum Kern, weniger HMGB2/3-Moleküle im Aktivierungsvolumen befinden und sich darüber hinaus auch nicht spezifisch dort ansammeln, ist die Bleachingrate gegenüber der Aktivierung im Kern deutlich reduziert. Viele aktivierte Moleküle werden in den Kern transportiert, gelangen aber nicht mehr zurück in das Aktivierungsgebiet im Zytosol. Somit überwiegt die Aktivierungsrate sogar der Bleachingrate, was in einer steigenden Gesamtintensität in der Zelle zum Ausdruck kommt. Aus den Messungen mit den beiden Aktivierungsregionen lässt sich der Schluss ziehen, dass ein schwacher Transport der HMGB2/3-Moleküle aus dem Kern in das Zytosol stattfindet und ein starker Transport aus dem Zytosol in den Kern hinein.

Die als Referenz eingefügte Messung mit dem Protein HMGB1 zeigt, dass dieses Protein ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist und keinen Transport in das Zytoplasma der Zelle zeigt. Die entsprechenden Messungen von einer Aktivierung mit HMGB1 Proteinen in Zytoplasma wurde ebenfalls durchgeführt. Da jedoch keine Aktivierung aufgrund

des Fehlens des Proteins in diesem Teil der Zelle erfolgte, wurden stets dunkle Bilder produziert. Auf eine Darstellung dieser Bilder wurde deshalb verzichtet.



(a) paGFP-HMGB4 im Kern aktiviert (vgl. Abb. 6.2 F-K)

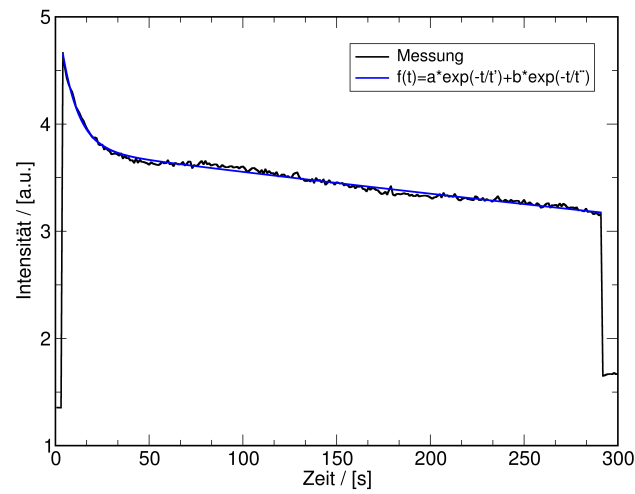


(b) paGFP-HMGB4 im Zytosol aktiviert (vgl. Abb. 6.2 U-Y)

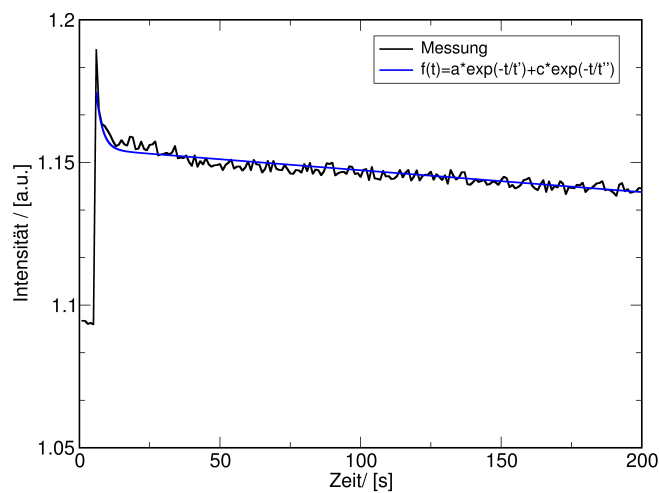
Abbildung 6.3: HMGB 2/3-Moleküle werden sowohl vom Zytosol in den Zellkern (bevorzugt) als auch vom Zellkern in das Zytosol transportiert.

In der Aktivierungszone überlagern sich drei unterschiedliche Prozesse, die Einfluss auf die Fluoreszenzintensität besitzen. Der erste Prozess ist die Anregung der Fluoreszenzmoleküle durch den Anregungslaser. Sie führt zu einem Anstieg der Intensität bis zu einem Sättigungswert bei dem alle Moleküle im Volumen angeregt sind. Aufgrund der kontinuierlichen Anregung ist die Zunahme bis zum Sättigungswert linear. Diesem fluoreszenzsteigernden Prozess stehen zwei diskriminierende Prozesse gegenüber, das Photobleaching und die Diffusion bzw. der Transport eines Moleküls aus dem betrachteten Volumen heraus. Das Ausbleichen eines Farbstoffs ist eine typische Eigenschaft dieser Moleküle, die nach einigen Anregungsprozessen nicht mehr angeregt werden können. Das Ausbleichverhalten ist von Farbstoff zu Farbstoff sehr unterschiedlich. Die beiden Prozesse Bleichen und Molekültransport bewirken einen exponentiellen Abfall des Signals.

Der Anstieg der Fluoreszenz bis zur Sättigung verläuft zu schnell für eine Detektion. Dies ist vor allem an den Zeitverläufen in Abb. 6.4 zu sehen, da die Intensität direkt nach dem Einschalten des Anregungslasers auf einen Maximalwert springt und im anschließenden Verlauf exponentiell abfällt. Um den Abfall genauer zu quantifizieren, wurden die Daten mit einer bi-exponential Funktion angefitet. Aufgrund der schwierigen Versuchsdurchführung, die nur sehr wenige erfolgreiche Messversuche ermöglichte, kann keine weitergehende Statistik bzgl. der Abklingzeiten vorgenommen werden. Die gezeigten Einzelmessungen liefern mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9897$ bei der Aktivierung im Kern und $R^2 = 0,9081$ eine sehr hohe Korrelation weshalb die berechneten Zeiten für die Diffusion und das Bleichen als legitime Richtwerte angesehen werden können. Die geringere Korrelation bei der Aktivierung im Zytosol ist zudem auf die geringere Gesamtfluoreszenz in dieser ROI zurückzuführen.



(a) Zeitverlauf paGFP-HMGB4 bei Aktivierung im Kern mit Fit, $t' = 8,984$ s, $t'' = 14914$ s



(b) Zeitverlauf paGFP-HMGB4 bei Aktivierung im Zytosol mit Fit, $t' = 2,277$ s, $t'' = 1695$ s

Abbildung 6.4: Aufgrund der Ansammlung der Moleküle im Kern ist die Diffusionskonstante t' bei der Aktivierung im Kern mit 8,984 s größer als im Zytosol mit 2,277 s, die Bleichkonstante t'' hingegen ist im Kern mit 1695 s kleiner als im Zytosol mit 14914 s.

Beim Vergleich der Zeitkonstanten für das Bleichen und den Transport im Kern und im Zytosol kann festgestellt werden, dass die Diffusionskonstante im Kern mit 8,984 s größer ist als im Zytosol und die Bleichkonstante mit 1695 s kleiner als im Zytosol mit 14914 s. Aufgrund der Ansammlung der Moleküle im Kern war eine geringere Diffusionskonstante als im Zytosol zu erwarten, da nur wenige Moleküle den Kern verlassen. Das darüber hinaus die Bleichkonstante kleiner ist, also die Moleküle schneller ausbleichen, ist ebenfalls durch die Ansammlung im Kern erklärbar. Aufgrund der Tatsache, dass die Moleküle lange im Kern verweilen und somit auch dementsprechend häufig im Anregungsvolumen angeregt werden, bleichen sie schneller aus. Die ermittelten Zeitkonstanten entsprechen somit den beobachteten Prozessen.

6.2 2-PLSM von humanem hyalinen Knorpelgewebe

Wie bereits in [Marti, 2006], [Marti, 2006b], [And, 2006] und [Yeh, 2005] gezeigt wurde, sind 2-PLSM Aufnahmen von markierungsfreiem, hyalinen, humanem Knorpel möglich. Dabei kann das SHG Signal oder das 2-Photonen Fluoreszenzsignal detektiert werden [Mat, 2009]. In diesen Arbeiten konnten bereits Unterschiede zwischen gesundem und geschädigtem Knorpelgewebe festgestellt werden. Jedoch sind keine Klassifizierungen oder objektive, automatische Auswerteverfahren entwickelt worden. In diesem Kapitel werden zunächst die verwendeten Detektionsmethoden dargestellt. Eine Auswertung der Bilder sowie eine Kategorisierung wird dann in Kapitel 6.4 vorgenommen.

Der variable Aufbau des 2-PLSM mit den verschiedenen bereits vorgestellten Detektionsmethoden bietet verschieden Möglichkeiten zur Anwendung auf humanes Knorpelgewebe.

6.2.1 Paralleler non-descanned Aufnahmemodus

In diesem Detektionsmodus können die Vorteile der multifokalen Anregung mit 64 parallelen Foki in Form einer sehr schnellen Detektion ausgenutzt werden. So kann ein Scanfeld von $350 \times 350 \mu\text{m}$ in 300 ms abgerastert und von der EMCCD-Kamera aufgenommen werden. Somit sind auch 3D-Bilerstapel, mit einem Bild pro μm Eindringtiefe (ca. $100 \mu\text{m}$) in wenigen Sekunden möglich.

Der größte Nachteil ist der große Crosstalk zwischen den Aufnahmepixeln der EMCCD-

Kamera. Bei einem stark streuenden Gewebe, wie es bei humanem Knorpel der Fall ist, gibt es eine große Anzahl nicht ballistischer Photonen. Diese werden auf dem Chip der EMCCD-Kamera demnach von einem „falschen“ Pixel erfasst und trägt zu einem starken Rauschen im Bild bei. Dieser Effekt macht sich vor allem in tieferen Schichten bemerkbar. In oberflächlichen Schichten können durchaus sehr kontrastreiche Bilder erstellt werden.

Die gleiche Detektionsmethode ist auch mit einem PMT als Detektionseinheit möglich, allerdings ist die Anregung mit lediglich einem Fokus möglich. Somit ist die Aufnahmezeit eines Bildes mit gleichen Dimensionen deutlich länger und braucht je nach Auflösung 1-3 Sekunden. Da der PMT Detektor zum einen sehr sensitiv ist und zum anderen die Streuung der Fluoreszenzphotonen keinen negativen Effekt auf den Kontrast des Bildes hat, sind auch die Bilder mit großer Eindringtiefe sehr kontrastreich.

6.2.2 Multifokaler, multispektraler Aufnahmemodus

Wie bereits in 4.1.2 beschrieben, werden acht Bilderstapel, bestehend aus acht Wellenlängenbereichen, gleichzeitig mit einem 64 Anoden-PMT aufgenommen. Die Auswertung dieser Bildinformationen erfordert noch eine nachträgliche Bearbeitung, da die acht Bilderstapel innerhalb der Probe zueinander verschoben sind. Dazu wird der individuell bestimmte Verschiebevektor angewendet. Der Vorteil dieser Detektionsmethode liegt in der gleichzeitig gewonnenen spektralen Information. Diese kann dazu verwendet werden, spektral unterschiedliche Objektbestandteile voneinander zu trennen. Bei großem spektralen Überlapp zweier Fluorophore kann das sogenannte *spectral unmixing* verwendet werden. Bei dieser Methode wird jedes Pixel einem Spektrum zugewiesen und kann dementsprechend farblich kodiert werden. Eine entsprechende Messung ist in Abbildung 6.5 dargestellt, in der die Zellen einer Orangenhaut zu sehen sind. In der spektralen Analyse konnten die Zellwände (in grün) und das Zytoplasma der Zellen (in rot) sehr deutlich voneinander unterschieden werden. Die Streifen am rechten Bildrand stammen aus der Verschiebung der Einzelbilder.

Wie in Abb. 4.2 gezeigt ist, wird die spektrale Aufspaltung des Fluoreszenzlichts mit Hilfe eines Geradsichtprismas realisiert. Um den Wellenlängenbereich der acht spektralen Kanäle bestimmen zu können, wurde eine Kalibration mit Hilfe von Bandpassfiltern im Detektionspfad durchgeführt. Diese wurden nacheinander in den Detektionspfad eingebracht und die Kanäle bestimmt, in denen noch ein Signal über einem gewissen Schwellwert detektiert werden konnte. Die Daten konnten durch eine Kalibrationskurve

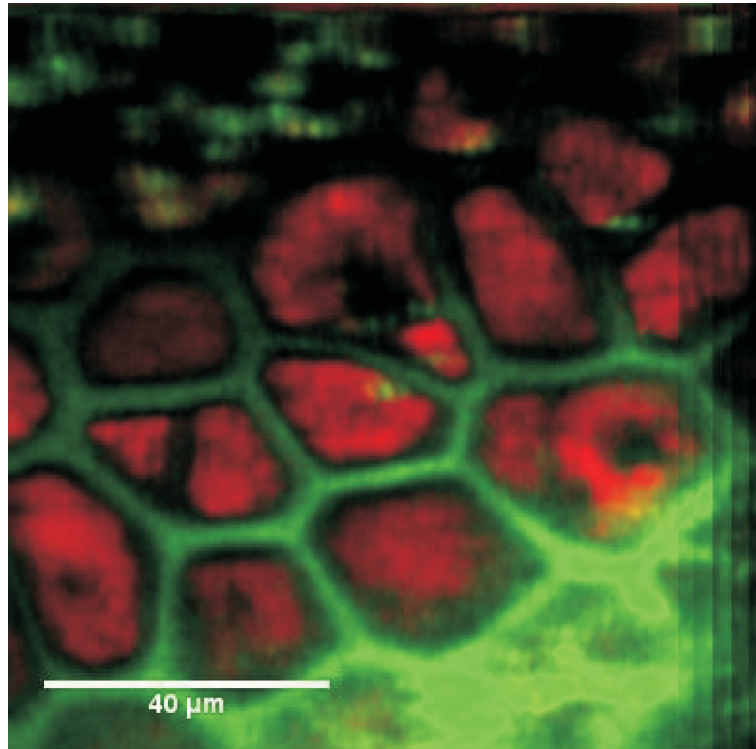


Abbildung 6.5: Zellen einer Orangenhaut aufgenommen mit multifokalem, multispektralem Detektionsmodus und anschließender Verschiebung der Einzelbilder sowie spektraler Entmischung.

angefittet werden 6.6. Als Stammfunktion wurde eine Exponentialfunktion angenommen¹. Aufgrund des kleinen Arguments im Exponenten entspricht die Kalibrationskurve jedoch fast einer Geraden und somit einer linearen spektralen Aufspaltung des Prismas.

6.2.3 Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzintensität ist ein Parameter, der mit dem Zustand des Knorpels in Zusammenhang gebracht werden kann. Es kann entweder der maximale Intensitätswert eines Bildes oder die mittlere Intensität bestimmt werden. Beide Werte sind Indikatoren für den Zustand des Knorpelgewebes. Eine dichte Kollagenstruktur der extrazellulären Matrix eines gesunden Knorpels erzeugt ein deutlich intensiveres Fluoreszenzsignal als einzelne Kollagenfasern. Dies drückt sich in einem höheren maximalen Intensitäts-

¹ $f(x) = 234,1 + 282,1 \cdot \exp(0,034 \cdot x)$

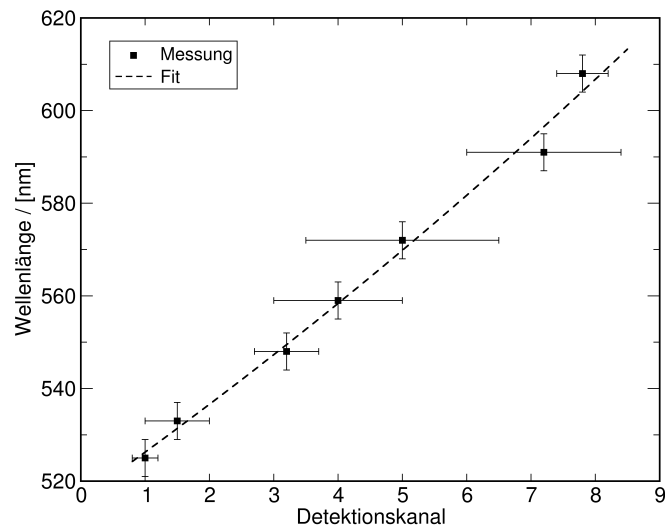


Abbildung 6.6: Spektrale Kalibration des 64-Anoden PMT's

wert aus 6.7. Der mittlere Intensitätswert ist darüber hinaus auch von der Struktur des Gewebes abhängig. Bei einer starken Zersetzung des Gewebes sind nur noch einzelne Faserstränge sichtbar und somit gibt es größere Flächen im Bild, die überhaupt nicht zum Fluoreszenzsignal beitragen.

Der mittlere Intensitätswert hat sich als robuster herausgestellt, da einzelne Artefakte oder Verunreinigungen innerhalb der Probe zu sehr hellen Bildpunkten führen können. Aus diesem Grund wurde dieser Parameter auch für die nachfolgende Auswertung der Fluoreszenzintensität zur Beurteilung des Knorpelzustands verwendet.

Im Folgenden wurden die 2-Photonen-Fluoreszenzaufnahmen stets mit den gleichen Parametern gemessen. Es wurden gleichzeitig 64 Foki mit jeweils ca. 4 mW verwendet. Das Fluoreszenzsignal wurde mit der EMCCD-Kamera aufgenommen. Der Scanbereich in der Fokusebene beträgt $350 \times 350 \mu\text{m}$. In der axialen Ebene wurden Aufnahmen bis zu einer Tiefe von $100 \mu\text{m}$ aufgenommen.

Bei den Proben handelte es sich um humanes Knorpelgewebe. Dieses konnte von einem Orthopäden bezogen werden, der in einem nahegelegenen Krankenhaus Knieoperationen durchgeführt hat. Das Gewebe wurde in Ringerlösung gelagert und wenige Stunden nach der Entnahme vermessen. Die Patienten waren zwischen 50 und 80 Jahren alt und es handelte sich sowohl um weibliche als auch um männliche Patienten.

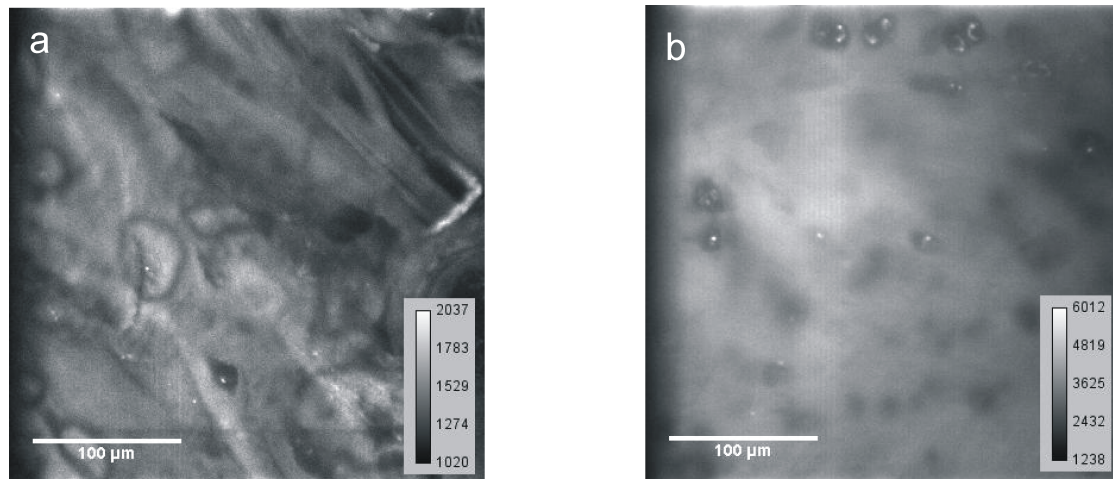


Abbildung 6.7: 2-Photonen Aufnahme zweier unterschiedlicher Knorpelproben. Der geschädigte Knorpel (a) hat eine ca. 5-mal geringere Fluoreszenzintensität als der gesunde Knorpel (b)

Aus jedem Bild wurde entlang der axialen Achse die integrierte Intensität berechnet. Sie entspricht der erzeugten und gemessenen Gesamtfluoreszenz in der jeweiligen Fokalebene. Der Verlauf der Gesamtintensität kann in Abhängigkeit von der Eindringtiefe aufgetragen werden. In Abbildung 6.8 sind einige ausgewählte Intensitätsverläufe dargestellt. Ein typischer Intensitätsverlauf besitzt zunächst einen steilen Anstieg. Die Messung beginnt immer wenige μm unterhalb der Oberfläche. Dringt die Fokusebene in das Knorpelgewebe ein, steigt auch das Intensitätssignal an. Eine planparallele Oberfläche zur Fokusebene erzeugt einen sehr steilen Anstieg im Fluoreszenzsignal. Ist die Knorpeloberfläche zur Scanebene geneigt oder gekrümmt, so nimmt die Steigung ab und das Intensitätsmaximum wird erst erreicht, wenn das Scanfeld komplett innerhalb des Knorpelgewebes liegt. Nachdem das Maximum erreicht wurde, fällt das Intensitätssignal aufgrund von Absorption und Streuung sowohl des Anregungslasers als auch des Fluoreszenzlichts exponentiell ab.

Es wurden Knorpelproben in unterschiedlichen Arthrostadien vermessen. Durch einen Vergleich des makroskopisch sichtbaren Zustandes des Knorpels und des Maximums der Intensitätsverläufe konnte ein deutlicher Zusammenhang festgestellt werden. Gesundes, intaktes Knorpelgewebe besitzt eine hohe Fluoreszenzintensität. Je weiter das Gewebe aufgrund einer fortschreitenden Arthrose zersetzt wird, desto geringer ist der Wert

des Maximums des Intensitätsverlaufs. In Abbildung 6.8 sind die gemittelten Intensitätsverläufe exemplarischer Knorpelproben dargestellt. Die Proben wurden so gewählt, dass gesunder und stark arthrotischer Knorpel in die Darstellung einbezogen wird. Es ist erkennbar, dass gesunder Knorpel eine deutlich höhere Gesamtintensität (ca. 4-fach) aufweist als stark arthrotischer Knorpel. Bei Einzelmessungen kann diese Intensitätsdifferenz bis auf das ca. 10-fache anwachsen.

Auffallend an den dargestellten Abklingkurven ist die deutlich größere Varianz der arthrotischen Knorpelprobe. Dies ist mit der Morphologie der Knorpelprobe zu erklären. Wie auf dem Foto des Knorpels zu sehen ist, unterscheiden sich die Bereiche innerhalb der Probe sehr stark. Auf dem Scheitelpunkt ist das Knorpelgewebe vollständig degeneriert und abgerieben. An den Seiten, an denen der mechanische Druck bei der Bewegung des Kniegelenks nicht so hoch ist, ist auch das Gewebe noch besser erhalten. Daraus resultiert ein höheres Fluoreszenzsignal. Eine gesunde Knorpelprobe ist über die gesamte Oberfläche homogen. Somit sind die Abweichungen im Fluoreszenzsignal entsprechend gering.

Die Gesamtintensität kann somit als Parameter zur Klassifizierung von humanem Knorpelgewebe verwendet werden, eine Klassifizierung anhand der Fluoreszenzintensität ist allerdings aufgrund der großen Inhomogenität der Proben schwierig. Da auch das Maximum des Intensitätsverlaufs von der Oberflächenkrümmung abhängt, liegt es in unterschiedlichen Tiefen zur obersten Eintrittsstelle. Somit ist die Vergleichbarkeit dieser Werte eingeschränkt.

6.2.4 Spektrale Fluoreszenzdetektion

Das Setup des 2-Photonen Mikroskops ermöglicht zwei verschiedene, spektrale Aufnahmemethoden. Entweder können verschiedene Filter des Filterrads im non-descanned Detektionsmodus oder es kann der multifokale, multispektrale descanned Detektionsmodus 4.1.2 verwendet werden.

Das in Abb. 6.9 a) gezeigte Bild wurde mit der multifokalen, multispektralen descanned Detektion aufgenommen. Der Spektralbereich erstreckte sich von 530-630 nm bei einer spektralen Breite von 12 nm pro Kanal. Die acht gleichzeitig aufgenommenen Bilder sind bereits mittels Verschiebevektor gegeneinander verschoben und summiert worden. Für die Chondrozyten und die extrazelluläre Matrix konnten unterschiedliche Spektren identifiziert werden. Via *spectral unmixing* konnten beide Bestandteile voneinander ge-

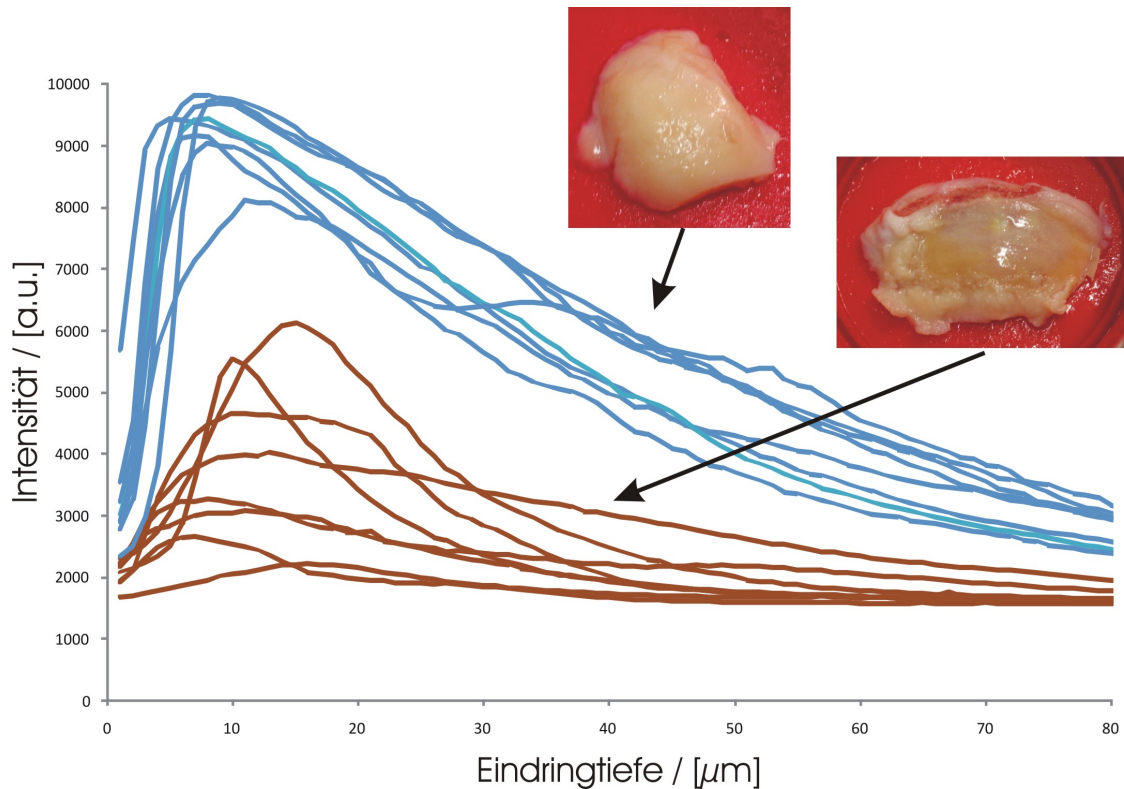


Abbildung 6.8: Intensitätsverläufe des 2-Photonen Fluoreszenzsignals unterschiedlicher Knorpelproben

trennt und durch eine Farbkodierung visuell voneinander separiert werden. Die gleiche Vorgehensweise wurde für den 3-dimensionalen Bilderstapel in Abb. 6.9 b) angewendet, sodass zwei Kanäle erstellt wurden. Ein Kanal für das Spektrum der Chondrozyten und ein Kanal für das Spektrum der extrazellulären Matrix. Für den Kanal der Chondrozyten konnte anschließend ein Intensitätsschwellwert gesetzt werden. Durch eine Identifizierung aller Objekte über diesem Schwellwert bis zu einer vorgegebenen räumlichen Ausdehnung konnten die Chondrozyten gefunden und durch eine Kugeldarstellung visualisiert werden. Die Anzahl der generierten Kugeln konnte gezählt und somit eine Chondrozytendichte bestimmt werden. Im dargestellten Volumen wurde ein Wert von $7,5 \cdot 10^6$ Chondrozyten pro cm^2 ermittelt.

Die Chondrozytenanzahl stellt einen Parameter dar, der mit dem Zustand des Knorpels in Verbindung gebracht werden kann. Allerdings besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Chondrozytenanzahl und dem Fortschreiten eines Knorpelzerfalls. Auf erste

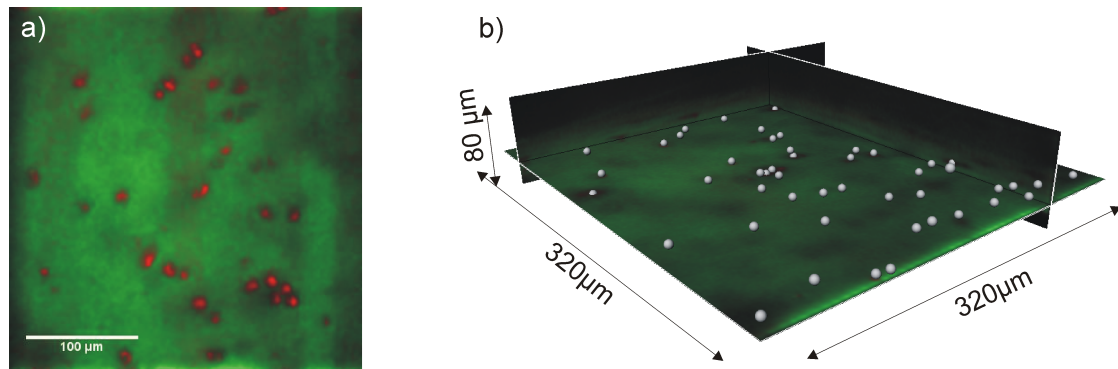


Abbildung 6.9: Spektralaufnahme Knorpel. a) Chondrozyten (rot) von extrazellulärer Matrix (grün) getrennt; b) Chondrozyten als Kugeln in 3D-Volumen zur Quantifizierung erkannt

Schäden des Knorpelgewebes reagiert das System durch einen gesteigerten Metabolismus der Chondrozyten und durch Neubildung von Zellen. Diese bilden sich in der Folge zumeist als Cluster aus. Insgesamt steigt die Anzahl der Chondrozyten aber im Anfangsstadium eines Knorpelzerfalls. Erst in einem späteren Stadium sinkt die Anzahl der Chondrozyten, wenn das Gewebe komplett degeneriert. Eine allgemeine Korrelation zwischen der Chondrozytenanzahl und dem Knorpelzustand lässt sich somit nicht herstellen.

6.2.5 Einteilung in die Outerbridge-Kategorisierung

Die Outerbridge-Kategorisierung ist eine anerkannte Methode zur Einteilung von Arthrostadien von humanem Knorpelgewebe. Sie stützt sich auf die makroskopisch sichtbaren Veränderungsmerkmale, die bei einer fortschreitenden Arthrose auftreten. Daher wird eine Korrelation zwischen den, mit dem 2-Photonen-Mikroskop, aufgenommenen Bildern und der Outerbridge-Kategorisierung angestrebt.

Als Datenquelle wurden 3-dimensionale Datenstapel verwendet, die mit dem parallelen, non-descanned EMCCD-Kamera Detektionsmodus aufgenommen wurden. Vor der mikroskopischen Bildgenerierung wurde der Knorpel fotografiert, um den makroskopisch sichtbaren Zustand zu dokumentieren. Die Mikroskopaufnahmen wurden jeweils mit 64 parallelen Strahlen bei einer Leistung von ca. 4 mW pro Fokus erstellt. Das Scanfeld besaß eine Größe von $350 \times 350 \mu\text{m}$. In der z-Ebene wurde die Probe zwischen zwei Auf-

nahmen jeweils um einen μm in die Tiefe verfahren. Bei 80 Aufnahmen pro Bilderstapel ergibt sich ein Aufnahmebereich von $80 \mu\text{m}$. Die Bilder wurden anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware *Imaris* zu einem 3-dimensionalen Bild zusammengefügt. Für alle Bilder wurde der gleiche Schwellwert verwendet. Die Kategorisierung wurde in Abbildung 6.10 zusammengefasst. Es sind alle fünf Kategorien der Outerbridge-Kategorisierung als Fotografie sowie als 3D-Visualisierung der 2-Photonen-Mikroskopieaufnahmen aufgeführt. Der Schädigungsgrad 0 entspricht gesundem Knorpel. Die Kategorie ist oben im Bild zu sehen. Der Knorpel weist eine gleichmäßige Struktur und Farbe auf. Die Oberfläche ist glatt und glänzend. Die TPLSM Aufnahme ist ebenfalls durch eine homogene extrazelluläre Matrix sowie eine sehr glatte Oberfläche charakterisiert. Der Knorpel des Schädigungsgrads 1 zeichnet sich durch eine homogene Struktur aus. Jedoch ist die Oberfläche etwas matter als beim Grad 0. Die extrazelluläre Matrix ist im TPLSM Signal homogen, die Dicke ist wegen der etwas geringeren Intensität in tieferen Schichten aufgrund des gleichen Schwellwertes geringer. Die Oberfläche weist kleine Stufen, Krater bzw. Ansätze der Zerfaserung auf. Der Knorpel des Grads 2 hat eine deutlich rauere, schwammartige Oberfläche. In den TPLSM Aufnahmen sind deutliche Auffaserungen mit Substanzverlust der extrazellulären Matrix zu erkennen. Der Knorpel der Kategorie 3 ist deutlich abgerieben worden. Es ziehen sich tiefe Rillen durch die mechanisch beanspruchten Bereiche. Ein großer Anteil ist bereits vollständig zerstört. In den TPLSM Bildern lassen sich durchgehend starke Auffaserungen mit deutlichem Substanzverlust erkennen. Es gibt schon Stellen, an denen die Intensität des Fluoreszenzsignals über den gesamten z-Bereich unterhalb des dargestellten Grenzwertes liegt und somit in den Darstellungen als Loch zu sehen ist. Die letzte Probe vom Grad 4 besitzt lediglich vereinzelte Inseln mit Knorpel. Der Rest ist vollständig zersetzt. In den Fluoreszenzaufnahmen sind kaum noch zusammenhängende Strukturen vorhanden. Es gibt nur noch vereinzelte Fasern.

Anhand der dargestellten Grafik 6.10 lässt sich eine große Übereinstimmung der makroskopischen Befunde am Knorpel und den Aufnahmen mit dem TPLSM erkennen. Es finden sich die gleichen Merkmale sowohl im makroskopischen Befund sowie in den Mikroskopiebildern wieder. Dem geübten Betrachter der TPLSM-Aufnahmen ist es möglich, die Bilder in die entsprechende Outerbridge-Kategorie einzuordnen.

Ein Problem besteht jedoch in der Inhomogenität der Knorpelproben. Nicht jeder Knorpelanteil eines Knochenkopfes ist der gleichen Kategorie einzuordnen. Dies kann an der rechten Knorpelprobe in Abbildung 6.8 sehr anschaulich gezeigt werden. Im unteren Teil der Probe ist das Knorpelgewebe vollständig zersetzt und abgerieben. Es ist in großen

Teilen direkt der Knochen zu sehen. Im oberen Teil hingegen ist noch durchaus intaktes Gewebe erkennbar. Es besitzt sogar eine homogene Struktur mit einer recht glatten Oberfläche. Dieser Anteil der Probe ist somit durchaus der Kategorie 1-2 zuzuordnen, wohingegen der untere Anteil in die Kategorie 4 entfällt. Diese makroskopisch offensichtlichen Unterschiede des Gewebes konnten auch bei der mikroskopischen Betrachtung festgestellt werden. Somit konnten bei Proben mit offensichtlichen Degenerationen gelegentlich auch signalstarke Aufnahmen mit homogener Matrixstruktur erstellt werden. Diese Tatsache erschwert die präzise Einteilung in die einzelnen Schädigungskategorien. Es war dennoch festzustellen, dass der Hauptanteil der Mikroskopaufnahmen auch dem makroskopischen Analogon entsprach. Knorpelproben werden, soweit nicht gesondert aufgeführt, im Folgenden immer in die Kategorie eingeordnet, die den größten Anteil der Probe ausmacht.

6.2.6 FLIM Detektion

Zunächst soll eine Validierung des aufgebauten FLIM-Systems vorgenommen werden. Dazu wurde der Farbstoff Rhodamin 6G verwendet. Dieser Farbstoff kann sehr effektiv mit einer 2-Photonen-Absorption angeregt werden und ist deshalb gut als Referenzsystem geeignet. Die gemessene Abklingkurve ist in Abbildung 6.11 dargestellt. In dieser Messung konnte eine Lebenszeit von 4 ns ermittelt werden. In der Literatur werden Werte von $4,3 \pm 0,3$ ns angegeben [Due, 2002] und konnten somit bestätigt werden.

Polle

Die Fluoreszenz-Lebenszeit Messungen sollen zunächst am Beispiel einer Polle dargestellt werden. Die Messung wurde mit einem Fokus mit der mittleren Laserintensität von ca. 4 mW durchgeführt. In dem in Abbildung 6.12 dargestellt Bild der Polle, wurden bereits die Histogramme zu den jeweiligen Pixeln ausgewertet und in einer Farbkodierung in das Bild integriert. Es ist eine deutliche Unterscheidung des inneren Kompartiments der Polle und dem Rest der Polle zu erkennen. Dies entspricht auch genau den bisherigen Erfahrung dieser Pollen aus spektralen Aufnahmen [Berg, 2007]. Der obere Graph der Abbildung zeigt die Lebenszeiten über alle Pixel des Bildes integriert. Es sind drei Maxima zu erkennen. Sie liegen bei 1,5 ns, 2,2 ns und 3,4 ns wobei die ersten beiden Maxima deutlich schärfer sind als das Letzte. Für die beiden Graphen neben der bildli-

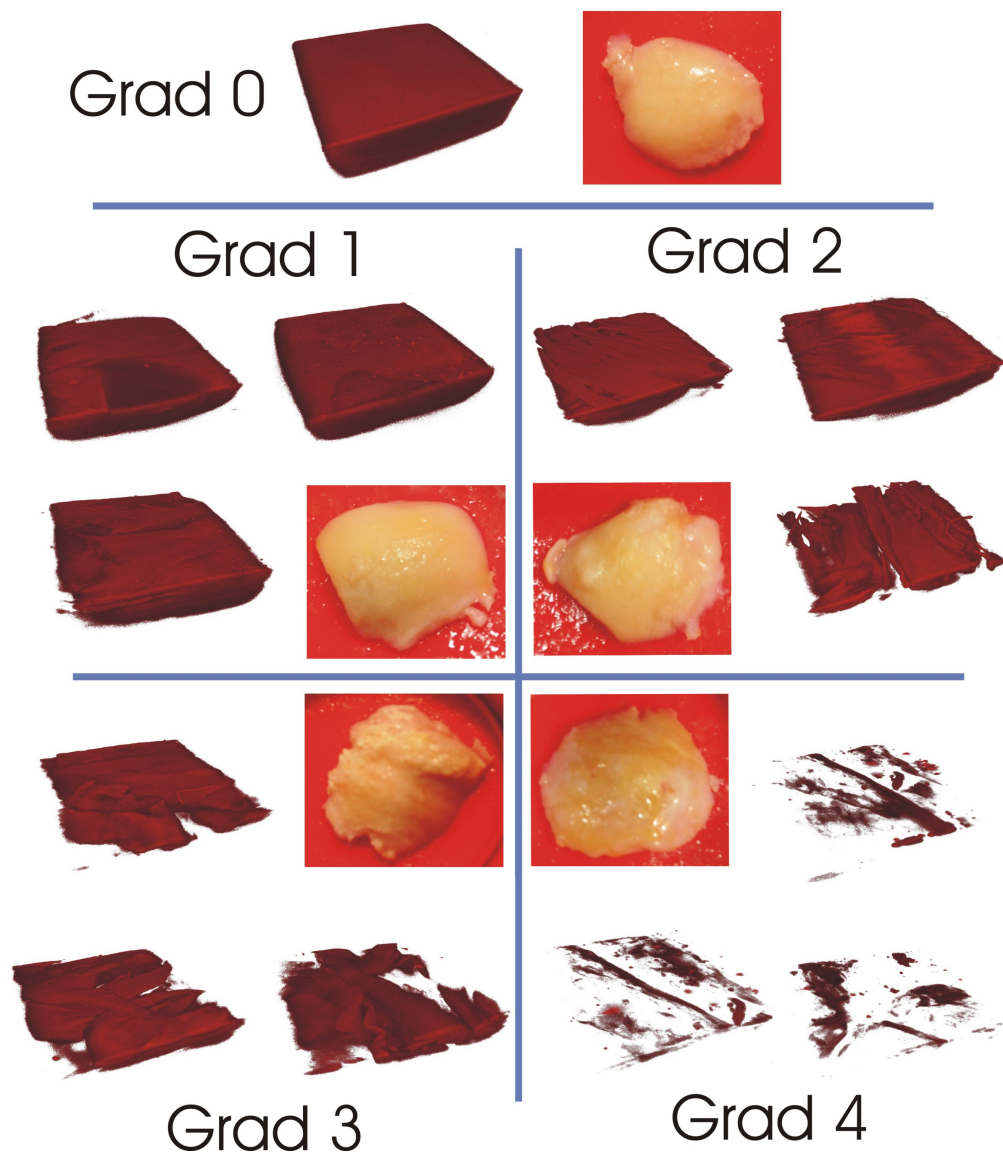


Abbildung 6.10: Einteilung von Knorpelproben in die Outerbridge-Kategorie. Oben ist eine gesunde Knorpelprobe dargestellt. Neben den Fotos der Knorpelproben sind jeweils drei ausgewählte Fluoreszenzaufnahmen in einer 3-dimensionalen Darstellung gezeigt.

chen Darstellung der Polle wurden ROI's² ausgewählt, um deren Fluoreszenz-Lebenszeit

²region of interest - ROI

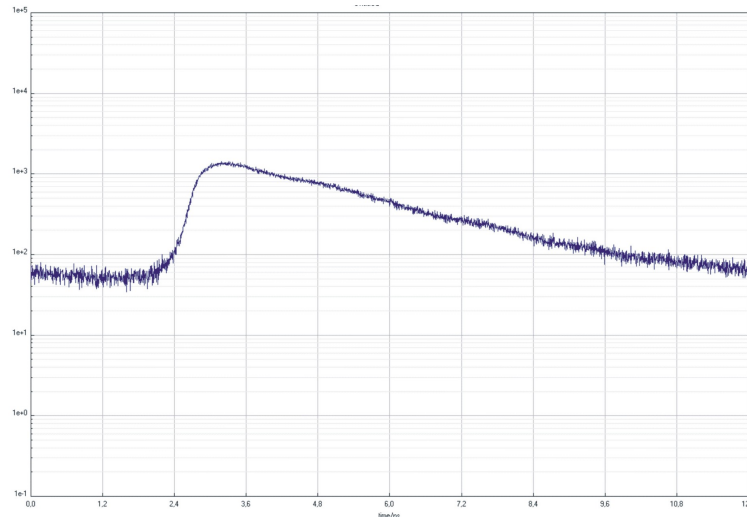


Abbildung 6.11: Zeitliche Abklingkurve (Fluoreszenzlebensdauer) des Farbstoffs Rhodamin 6G, $\tau = 4$ ns

anzuzeigen. Man erkennt deutlich, dass die beiden ausgewählten Bereiche unterschiedliche Lebenszeiten aufweisen und dass die Lebenszeiten zu den beiden ersten Peaks des Gesamtbildes gehören. Der letzte, breitere Peak des Gesamtbildes entspricht keinem diskreten Kompartiment der Polle, er gehört vielmehr zum Hintergrundrauschen des Bildes. Abschließend bleibt somit aus diesem Beispiel festzustellen, dass eine Differenzierung anhand der Fluoreszenz-Lebenszeit am Beispiel dieser Polle gut funktioniert hat. Die Bereiche konnten sehr deutlich voneinander unterschieden werden und entsprechen den Ergebnissen aus spektralen Aufnahmen dieses Pollentyps sehr gut.

Chondrozyten

Die FLIM-Aufnahme eines Chondrozyts ist in Abbildung 6.13 dargestellt. Sie ist mit einem 60x Objektiv aufgenommen worden. Es ist ein einziges Chondrozyt mit seiner umgebenden extrazellulären Matrix zu sehen. Die Farbkodierung der Lebenszeit macht deutlich, dass der Kern der Chondrozyten-Zelle eine kürzere Lebenszeit aufweist (2,4 ns) als die extrazelluläre Matrix (2,9 ns). Die Maxima im Lebenszeit-Diagramm liegen 0,5 ns auseinander. Bei einer FWHM³ des Peaks der extrazellulären Matrix von 0,3 ns genügt dieser Abstand dem Abbeschen Auflösungsvermögen. Im gesamten Lebenszeit-

³full width half maximum - FWHM

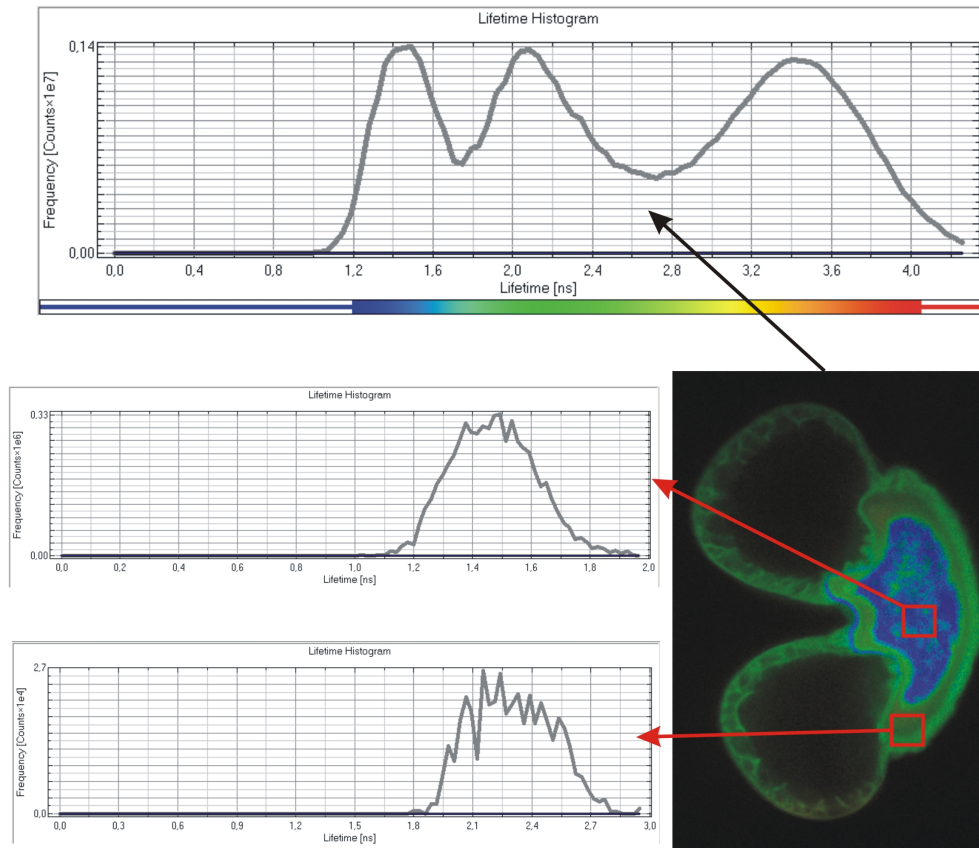


Abbildung 6.12: FLIM Darstellung einer Polle. Das Innere und die Membran der Polle können anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzlebenszeit (1,5 ns im Innern, 2,2 ns Membran) voneinander getrennt werden.

Diagramm lässt sich der Peak des Chondrozytenkerns nicht identifizieren, da dieser nur wenige Pixel des Bildes ausmacht und somit die Countrate für diese Lebenszeit nicht ausreicht, um sich vom Rauschen des Signals abzuheben. Dies kann nur durch selektive Auswahl der entsprechenden Pixel erreicht werden. Das Lebenszeit-Diagramm des Chondrozyts besteht im Gegensatz zum gaußförmigen Verlauf des Gesamtbildes aus einzelnen Peaks. Dies ist jedoch lediglich eine Folge der wenigen Pixel, die für dieses Diagramm zugrunde liegen. Für das Gesamtbild entsteht aus der Summation über alle Pixel die Gaußverteilung.

Es kann also festgestellt werden, dass der einzige Zelltyp in menschlichem Knorpelgewebe, die Chondrozyten, anhand der Fluoreszenz-Lebenszeit vom umliegenden Gewebe

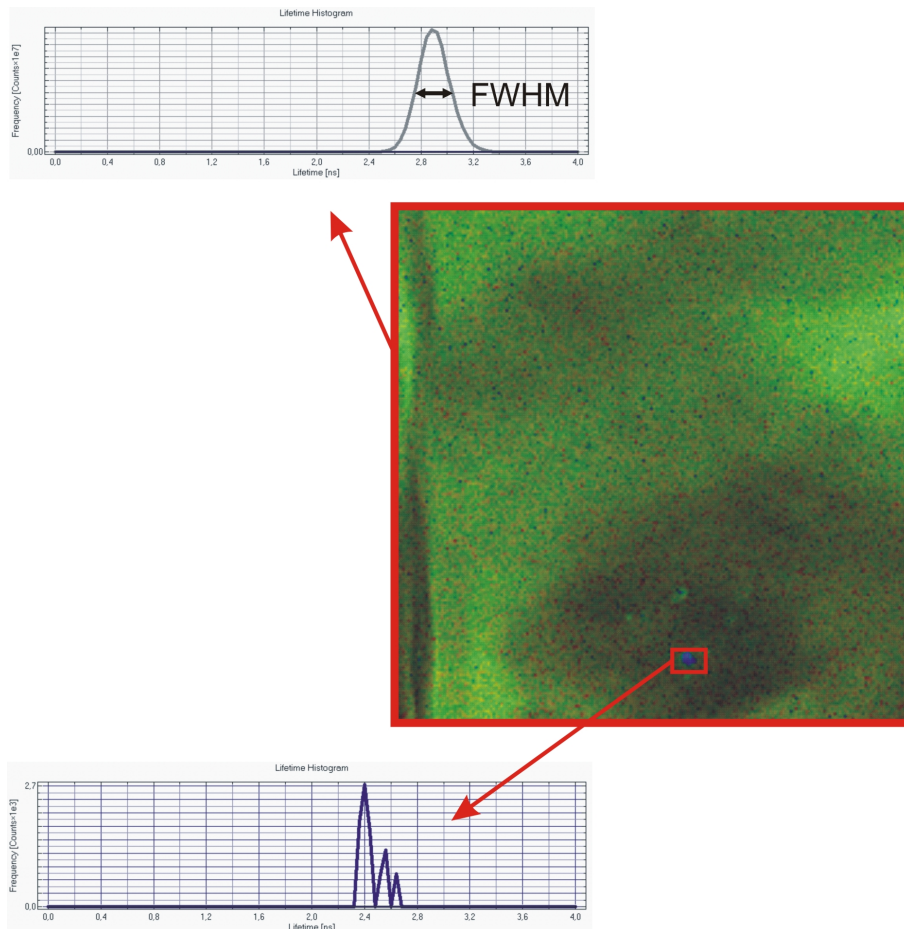


Abbildung 6.13: FLIM Darstellung von humanem Knorpelgewebe. oben: Lebenszeit-Diagramm des Gesamtbildes; unten: Lebenszeit-Diagramm des ausgewählten Bereichs (roter Kasten) eines Chondrozyts

differenziert werden kann.

Ein ähnliches Ergebnis kann auch durch die spektrale Zerlegung des Fluoreszenzlichts erreicht werden. Da spektrale Aufnahmen deutlich schneller (wenige Sekunden im Gegensatz zu wenigen Minuten) sind, werden auch 3-dimensionale Aufnahmen von menschlichem Knorpelgewebe ermöglicht. Nur aus einem 3-dimensionalen Datensatz können Ergebnisse wie Chondrozytenanzahl bzw. -dichte berechnet werden. Somit bleibt die spektrale Zerlegung aufgrund der Aufnahmegeschwindigkeit die erste Alternative für dieses Ergebnisziel.

6.3 Endoskopischer Aufbau

Zur Charakterisierung der Abbildungseigenschaften des mikroendoskopischen Aufbaus wurde zunächst die Auflösung mit Hilfe eines USAF Testtargets bestimmt. Dazu wurde das Testtarget am Ende des Faserbündels platziert und mit einer Lampe beleuchtet. Um eine gleichmäßige Beleuchtung zu erhalten, befand sich zwischen der Lampe und dem Testtarget eine Mattglasscheibe. Das Licht, welches durch das Faserbündel propagiert, wird über das Mikroskop mit der EMCCD Kamera aufgenommen. Die Aufnahmesituation entspricht somit derjenigen bei der 2-Photonen Mikroendoskopie.

Der Kontrast des Targets wird in drei Kategorien eingeteilt. Von hohem Kontrast wird bei einem Unterschied von größer als 2.0 ± 0.05 zwischen hellen und dunklen Bereichen, von mittlerem Kontrast bei einem Wert von 0.80 ± 0.05 und von niedrigem Kontrast bei einem Wert von 0.2 ± 0.05 gesprochen [Gly].

Die Größe der Balken auf dem Testtarget kann berechnet werden. Die kleinsten Balken in der Gruppe 6 auf dem Target sind $21,923 \mu\text{m}$ lang und $4,385 \mu\text{m}$ breit. Aus diesen Angaben kann der Kalibrationswert für die Ausdehnung eines Pixels auf der Kamera zu $1,59 \mu\text{m}$ Pixeln μm ermittelt werden.

Abbildung 6.15 zeigt einen Profilplot des Testtargets. Der gemessene Bereich ist als Bildausschnitt darüber zu sehen. Um den Kontrast und somit die Einteilung in die bereits genannten Kategorien bestimmen zu können, wurde das Minimum zwischen den Balkengruppen als Referenzwert für die jeweilige Gruppe verwendet. Auf dieser Grundlage konnten die Intensitätswerte der Balken bzw. der Mittelwert über jeweils drei Balken bestimmt werden. Die Werte sind in Tabelle 6.3 dargestellt. Für die kleinsten Strukturen der Gruppe 6 auf dem Testtarget beträgt der Wert für den Kontrast zwischen den hellen und dunklen Balken 2,4. Dieser liegt noch oberhalb der Grenze von 2,0 des Bereichs mit hohem Kontrast. Die Grenze der Auflösung für den mikroendoskopischen Aufbau ist demnach noch nicht ganz erreicht worden. Es ist jedoch aufgrund des Verlaufs in der Gruppe 6 abzuschätzen, dass in der nächsten Gruppe die Auflösungsgrenze erreicht würde und somit in einem Bereich von ca. $4 \mu\text{m}$ liegt. Die dargestellte Messung bezieht sich auf die Verwendung eines 20x-Objektivs zur Ein- und Auskopplung in das Faserbündel. Der Sichtbereich dieses Objektivs deckt jedoch nicht die gesamte Faserendfläche ab, sodass mit diesem Objektiv vor allem kleine Proben betrachtet wurden. Die ermittelte Auflösung stellt somit die größtmögliche Auflösung dar. Das Sichtfeld eines 60x-Objektivs ist für diesen Aufbau zu klein, da nur noch wenige Faserenden gescannt

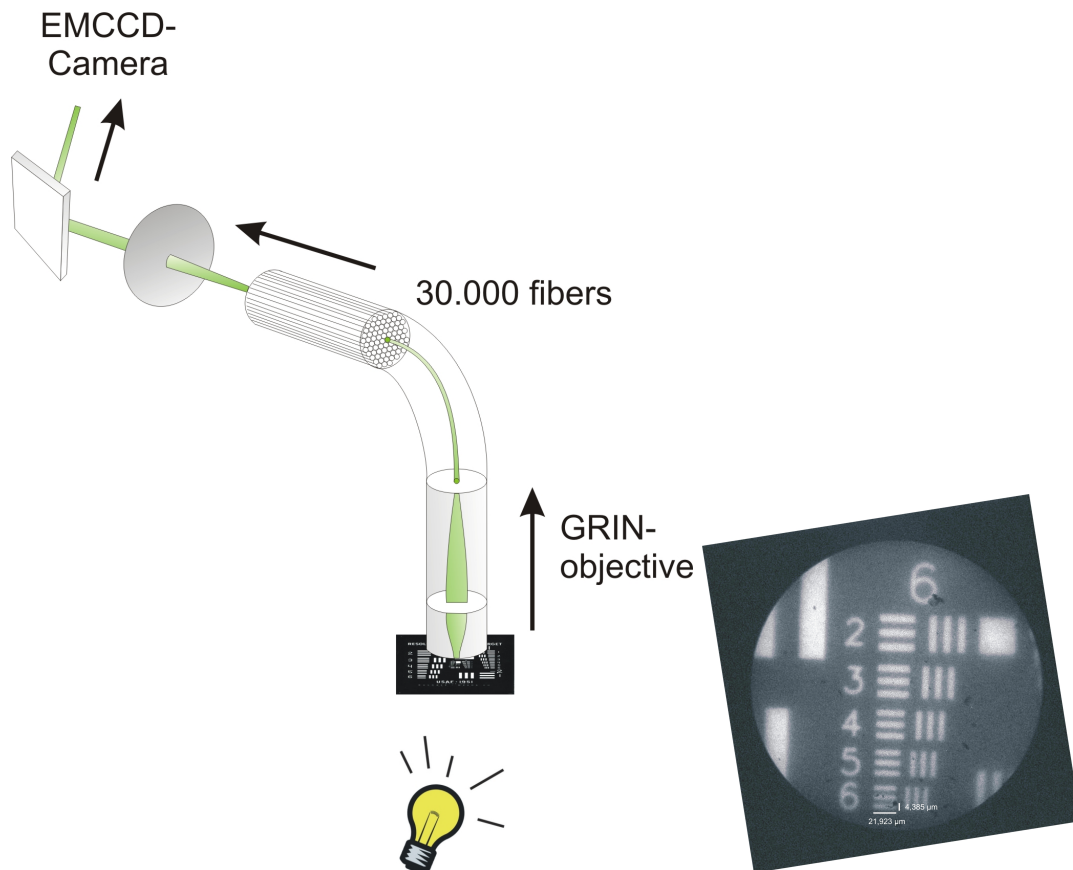


Abbildung 6.14: links: Aufbau zur Darstellung eines USAF Testtargets mit dem endoskopischen Aufbau; rechts: EMCCD-Kamera Bild des USAF Testtargets

werden. Bei der Verwendung eines 10x-Objektives kann die gesamte Faserbündelendfläche gescannt und erfasst werden.

6.3.1 Polle

Als Testobjekt wurde auch für den endomikroskopischen Aufbau eine Polle abgebildet. Die Bilder sind in Abbildung 6.16 dargestellt. Zum Vergleich ist in der Abbildung eine Aufnahme einer Polle mit dem non-descanned PMT Aufnahmemodus hinzugefügt worden. Die Abbildungseigenschaften der non-descanned PMT Detektion sind der mikroendoskopischen Detektion deutlich überlegen. Die Vergleichsaufnahme wurde jedoch auch mit einem 60x Mikroskopobjektiv aufgenommen. Der endoskopische Aufbau hin-

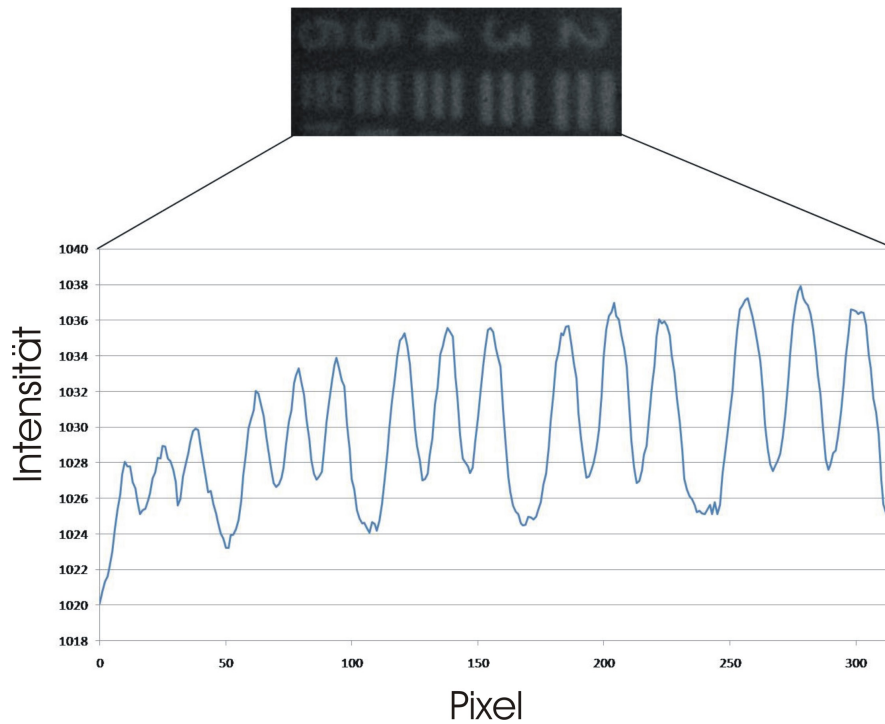


Abbildung 6.15: Die Balken der 6. Gruppe des USAF Testtargets (oben) können im Intensitätsverlauf dargestellt werden und das Kontrastverhältnis kann berechnet werden

Gruppe	Kontrastverhältnis (heller Balken/dunkler Balken)
Gruppe 6.2	4,0
Gruppe 6.3	5,5
Gruppe 6.4	3,7
Gruppe 6.5	3,0
Gruppe 6.6	2,4

Tabelle 6.1: Tabelle mit den gemessenen Werten für das Kontrastverhältnis zwischen den dunklen und den hellen Balken des USAF Testtargets

gegen entspricht annähernd der Vergrößerung eines 20x Objektivs.

Die Form und Struktur des abgebildeten Objekts kann mit der mikroendoskopischen Aufnahme identifiziert werden. Der Durchmesser der Polle beträgt ca. 80 μm . Die ein-

zelenen optischen Fasern des Faserbündels sind etwas verschwommen zu erkennen. Eine Bildbearbeitung kann die Abbildung hinsichtlich der Abbildungsschärfe deutlich steigern (6.16 c))

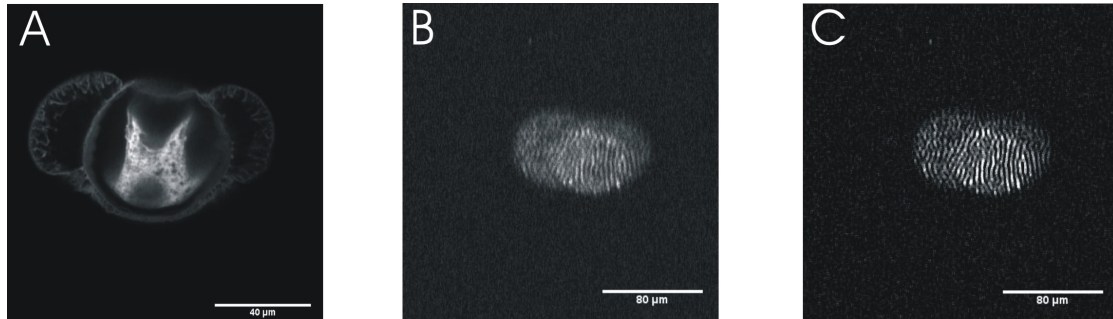


Abbildung 6.16: Die Auflösung mit dem mikroendoskopischen Aufbau (b,c) ist deutlich geringer als mit der descanned PMT Detektion (a). Mittels Bildverarbeitung werden die einzelnen Fasern deutlich hervorgehoben (c). Dargestellt ist jeweils die gleiche fluoreszierende Polle.

6.3.2 *Ficus benjamini*

Das Blatt eines *ficus benjamini*-Baumes wurde als ein weiteres Messobjekt verwendet, um die Abbildungseigenschaften des mikroendoskopischen Versuchsaufbaus zu testen. Der endoskopische Aufbau konnte in diesem Fall sowohl mit der EMCCD-Kamera (Andor Ixon) als auch mit dem PMT (Hamamatsu 7422) als Detektionseinheit verwendet werden. Dargestellt sind diese Aufnahmen in Abbildung 6.17 zusammen mit einem hochauflösten Bild im non-descanned PMT Detektionsmodus. Die beiden Bilder des endoskopischen Aufbaus weisen deutlich weniger Details auf als der non-descanned PMT Detektionsmodus. Es lassen sich jedoch die rudimentären Strukturen des Blattes wie z.B. die Poren (in den Bildern als dunkle Kreise erkennbar) auflösen. Die endoskopische Detektion mit dem PMT erscheint im Gegensatz zur Kameradetektion noch detailreicher. Im Gegensatz zur Bildbearbeitung der Polle in 6.3.1 wurde hier ein Gauß-Filter verwendet. Dieser schärft nicht die einzelnen Bildpunkte um die einzelnen Faserenden besser aufzulösen sondern er glättet das gesamte Bild. Um das Signal zu Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) zu bestimmen, wurde die Schwankung im Minimum (innerhalb der Pore) verwendet und als Profilplot in Abbildung 6.18 dargestellt. Die ermittelten Werte für das S/N-Verhältnis sind in Tabelle 6.3.2 aufgeführt. Die Werte bestätigen den visuellen

Eindruck der Bilder. Der endoskopische Kamera Aufnahmemodus erreichte das kleinste S/N-Verhältnis und erscheint auch auf den Bildern am detailärmsten. Die Detektion im endoskopischen Modus mit dem PMT liefert ein besseres S/N-Verhältnis. Im Bild sind die Ansätze von feineren Blattstrukturen erkennbar. Beide Verhältnisse liegen jedoch weit unter dem S/N-Verhältnis des non-descanned Detektionsmodus.

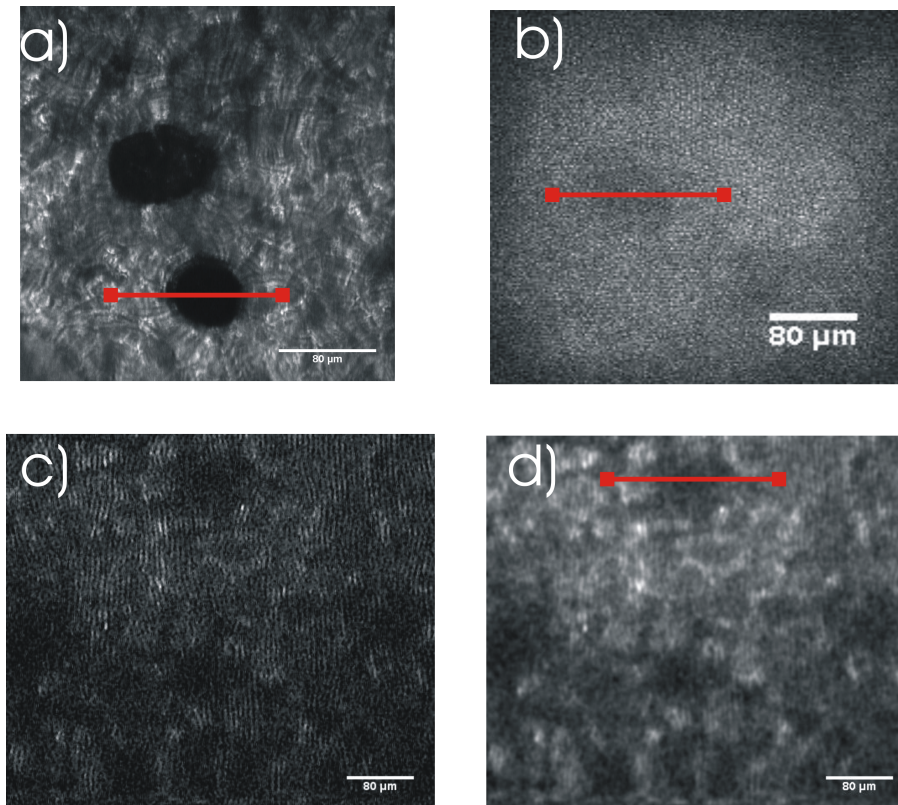


Abbildung 6.17: Autofluoreszenz eines *Ficus Benjamini*-Blattes mit verschiedenen Aufnahmemethoden; a) non-descanned PMT Detektion; b) mikroendoskopische Kamera-Aufnahme; c) mikroendoskopische PMT-Aufnahme; d) bearbeitete mikroendoskopische PMT-Aufnahme. Entlang der rot eingezeichneten Linien wurde Profilplots erstellt (s. Abb. 6.18).

6.3.3 2-Photonen Absorption

Um einen Nachweis über die 2-Photonen Absorption zu geben, soll die quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität zur Anregungsintensität ausgenutzt werden. Als

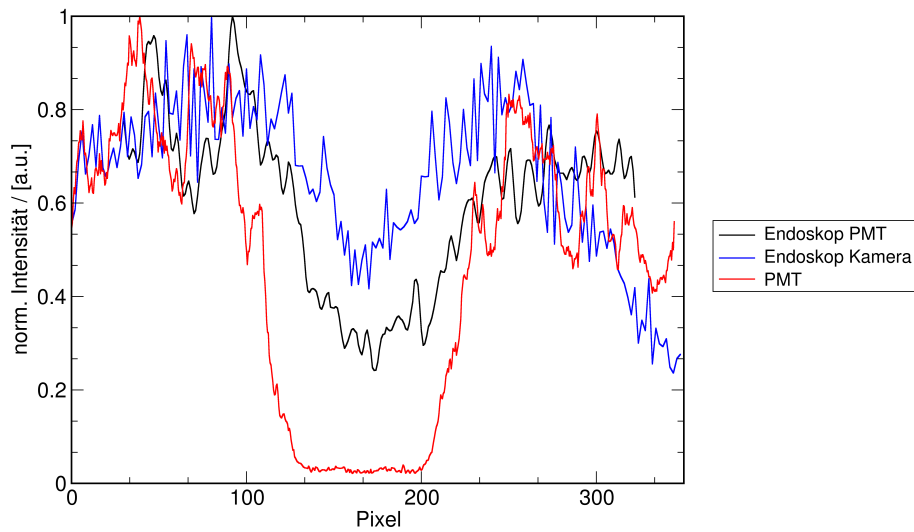


Abbildung 6.18: Verlauf der Intensität entlang der in Abb. 6.17 eingezeichneten Linien durch eine Pore des Blattes eines *ficus benjamini*. Die Graphen wurden normiert und auf der x-Achse verschoben, sodass die Poren übereinander liegen.

Aufnahme	S/N-Verhältnis
endoskopisch PMT	1,5
endoskopisch Kamera	2
non-descanned PMT	23

Tabelle 6.2: Tabelle mit den ermittelten Werten für Signal zu Rausch Verhältnis der Aufnahmen eines *ficus benjamini* Blattes

Messobjekt wurde dazu noch einmal eine Polle verwendet. Diese wurde mit variierenden Anregungsintensitäten detektiert. Der Verlauf der über das Pollenkorn integrierten Gesamtintensität ist in Abbildung 6.19 dargestellt. Die Daten wurden mit der Funktion $f(x) = a \cdot x^b + c = 0,045 \cdot x^{1,94} + 4,89$ angefitet. Der asymptotische Standardfehler für den Parameter b liegt bei 1,17%. Die Potenz liegt mit einem Wert von 1,94 nah an der erwarteten quadratischen Abhängigkeit.

Die gezeigte, quadratische Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Anregungsintensität weist somit den Vorgang der 2-Photonenabsorption nach.

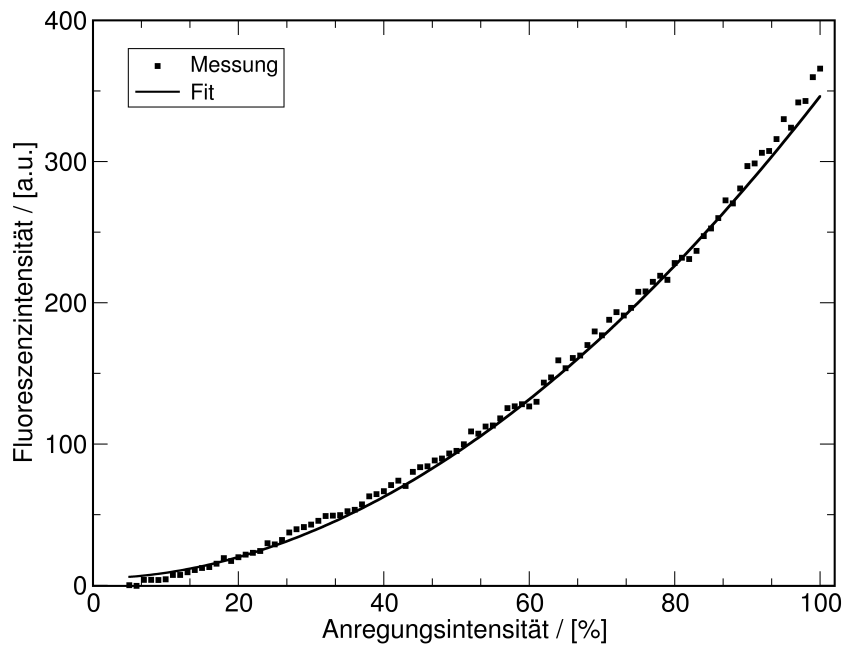


Abbildung 6.19: Quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität eines Pollenkorns zur Anregungsintensität des Lasers (Punkte). Die Kurve zeigt die angefitzte Funktion $f(x) = 0,045 \cdot x^{1,94} + 4,89$.

6.3.4 Humaner Knorpel

Für diese Messungen wurde tierisches Knorpelgewebe⁴ verwendet, da zu diesem Zeitpunkt kein humanes Knorpelgewebe zur Verfügung stand. Aufgrund einer niedrigeren Fluoreszenzausbeute von Knorpelgewebe als von den bisher genannten Proben, war die Bildgebung deutlich erschwert. Eine Einzelaufnahme bzw. ein deutliches Fluoreszenzsignal konnte mit dem gezeigten Aufbau nicht erzeugt werden. Eine deutliche Steigerung der Bildqualität kontrastarmer Bilder kann durch die Summation mehrerer Einzelbilder erzeugt werden. Diese Technik wird auch in kommerziellen Laser-Scanning Mikroskopen verwendet. In Abbildung 6.20 ist der Unterschied zwischen einem Einzelbild und dem Summationsbild aus zehn Einzelbildern gezeigt. Für eine weitergehende Analyse wie der quadratischen Intensitätsabhängigkeit zum Nachweis der 2-Photonen Bildgebung, spektrale Charakteristiken oder morphologische Analysen des Gewebes ist das Signal jedoch

⁴von einem frischen Hähnchenschenkel

weiterhin zu schwach.

Aus den Erfahrungen mit dem System kann davon ausgegangen werden, dass diesem Bild eine 2-Photonenabsorption zugrunde liegt. Vor allem weil das Bild im Scanbereich nicht homogen erscheint. Es sind Regionen mit stärkerem und schwächerem Signal zu erkennen. Dies schließt einen signalerzeugenden Effekt an der Einkopplenseite des Faserbündels somit aus. Weiterhin konnte das Bild lediglich bei einem stabilen Betrieb des Ti:Sa-Lasers erzeugt werden, was zusätzlich für eine 2-Photonen Absorption spricht.

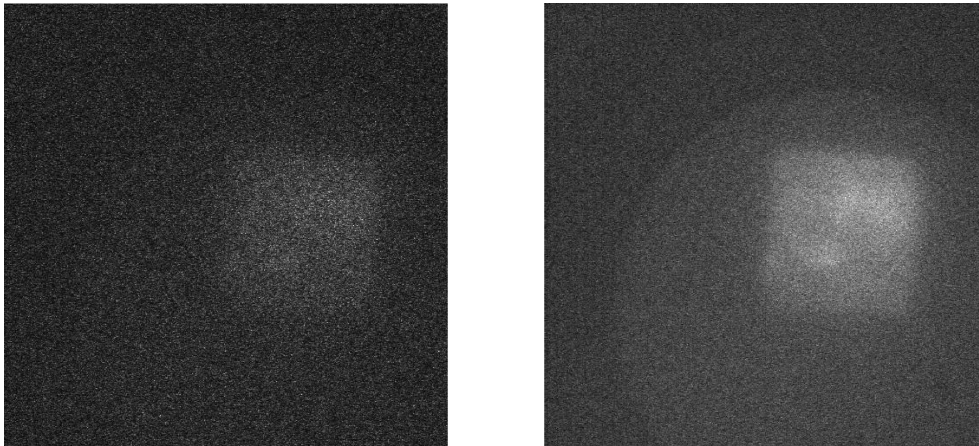


Abbildung 6.20: Schwaches Fluoreszenzsignal von endoskopisch aufgenommenem Knorpelgewebe. links: Einzelbild; rechts: Summationsbild aus 10 Aufnahmen.

6.4 Wavelet-basierte Bildanalyse

Die auszuwertenden Daten, die mittels 2-Photonen Mikroskopie erstellt wurden, sollen untersucht werden um Bildeigenschaften für die Kategorisierung in ihre Arthrostadien zu finden. Basierend auf einer diskreten Wavelet-Analyse werden Bildeigenschaften berechnet. Um morphologische Charakteristiken der Bilder mit dem Merkmalsraum, aufgespannt von den Merkmalen aus der diskreten Wavelet-Analyse, zu verknüpfen, werden SOM's verwendet.

Das Prinzip einer Wavelet-basierten Bildanalyse mit einer Darstellung des multidimensionalen Datensatzes mittels SOM bzw. PCA wurde in einer ähnlichen Form in [Les, 2007] vorgestellt.

Für die Umsetzung der Bildauswertung wurde die Software *MATLAB* verwendet, insbesondere mit der *SOM Toolbox* [Ves, 1999].

6.4.1 Datensatz

Der verwendete Datensatz besteht ausschließlich aus 2-Photonen Fluoreszenzaufnahmen von humanem Knorpel. Detektiert wurde das Fluoreszenzsignal im parallelen non-descanned EMCCD-Aufnahmemodus. Jeder einzelne Datensatz besteht aus 30 Bildern, die jeweils im Abstand von einem μm in z-Richtung aufgenommen wurden. Es wurde eine Gesamtzahl von 660 Bildern betrachtet.

Die Proben entstammen, wie bereits in Kapitel 6.2.3 beschrieben, Patienten einer Knie-OP mit einem Alter zwischen 50 und 80 Jahren bei sowohl weiblichen als auch männlichen Patienten.

Eine visuelle Einteilung der Daten in gesunden Knorpel, anfangende Degeneration, fortschreitende Degeneration und fast vollständige Degeneration wurde aufgrund der bisherigen Erfahrungen durchgeführt. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Auswertung nicht auf diesen Einteilungen basiert, sondern lediglich zur besseren Orientierung und Visualisierung der Daten helfen soll.

Abbildung 6.21 zeigt eine schematische Einteilung des Arthrosefortschritts. Die Umrandung der jeweiligen Bilder kodiert die bereits erwähnte Kategorisierung der Bilder und wird auch im Folgenden so beibehalten. Die linke, grüne Spalte zeigt gesunden Knorpel. Die extrazelluläre Matrix besitzt eine homogene Struktur, die Chondrozyten sind in der Matrix verteilt. Die zweite, gelbe Spalte stellt eine Auffaserung der Oberfläche dar. Die darunterliegende extrazelluläre Matrix ist noch weitestgehend intakt, die Chondrozyten tendieren zur Clusterbildung. Die dritte, blaue Spalte zeigt einen deutlichen Abbau des Knorpelgewebes. Es bilden sich deutliche Zerklüftungen, Chondrozyten sind nur noch vereinzelt zu finden. Die rechte, rote Spalte zeigt den nahezu vollständigen Verlust des Knorpels. Teilweise ist die Knorpelschicht bis auf den Knochen abgebaut. Die bisher gezeigten Kategorien entsprechen den Outerbridge-Kategorien. Die letzte Klasse, in der der Knorpel bereits vollständig degeneriert ist, wurde für die Farbkodierung in der Bildauswertung nicht verwendet. Vollständig zerstörter Knorpel kann kein nennenswertes Fluoreszenzsignal erzeugen, weshalb diese Kategorie nicht in diese Texturanalyse integriert wurde.

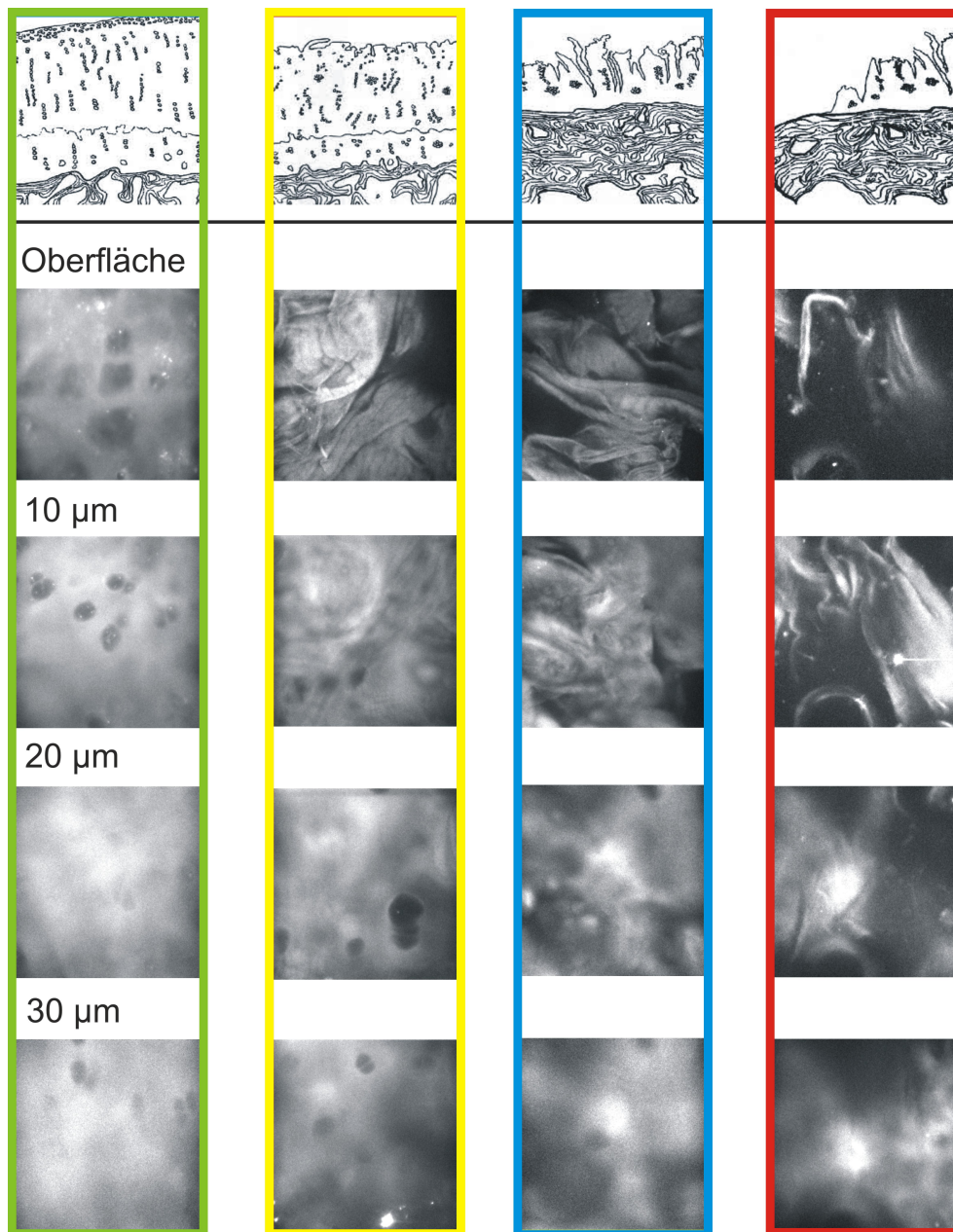


Abbildung 6.21: Obere Reihe: Schematische Einteilung des Knorpelzustands in Arthrostadien. Darunter, entsprechend der Kategorie, 2-Photonen-Fluoreszenzbilder in der jeweiligen Eindringtiefe

6.4.2 Merkmalauswahl

Die Bilder zeigen drei wesentliche Bildstrukturen die von der automatisierten Analyse erkannt werden müssen. Dies sind erstens die kleinen, runden Chondrozyten, die sich mit einem scharfen Rand von der umgebenden Matrix abgrenzt. Diese Struktur ist charakteristisch für gesundes Knorpelgewebe. Die zweite Struktur sind die Fissuren, die bei der Auffaserung der Oberfläche entstehen. Es sind meistens längliche, Strukturen mit scharfen Kanten. Sie bilden auf einer deutlich größeren Skala als die Chondrozyten teilweise runde Strukturen wie z.B. Kringel. Eine bevorzugte Richtung kann nicht ausgemacht werden. Die letzte Struktur, die nur bei fortgeschrittener Arthrose eintritt sind diffuse, verwaschene Ränder und Grenzflächen. In diesen Bildern sind keine Scharfen Kanten vorhanden. Daraus resultierend muss eine Strukturanalyse skalen- bzw. größenabhängige Strukturen sowie orientierungsabhängige Texturen (runde und längliche Merkmale) unterscheiden können. Mittels der DWT müssen geeignete Merkmale gefunden werden, die den Datensatz für den speziellen Zweck der Kategorisierung gut repräsentiert.

In der Literatur sind viele Beispiele von verwendeten Merkmalen bzw. Vergleichsstudien von Merkmalen hinsichtlich ihrer Klassifizierungseigenschaften von Texturen zu finden [Les, 2007b], [Ran, 1999], [Cha, 1993], [Wou, 1993]. In diesen Arbeiten konnte jedoch kein klares „Gewinner“-Merkmal bestimmt werden. Als Ergebnis lässt sich feststellen, dass die Merkmalsauswahl an das individuelle Problem angepasst werden muss, um die geeignetsten Merkmale herauszufinden. Die Entwicklung einer Methode zur Filterung von Merkmalen und deren Einfluss auf die Klassifizierung wäre in diesem Zusammenhang erstrebenswert.

Als Grundlage für die Textur-Merkmale wurde die Arbeit von [Liv, 1996], in der Korrosionsbilder mittels Wavelet-Analyse untersucht und klassifiziert wurden sowie die Arbeit von [Les, 2007], in der die Wavelet-Analyse zur Tumordiagnostik eingesetzt wurde, verwendet.

Zunächst wurde eine DWT bis zur sechsten Iterationsstufe durchgeführt. Auf jeder Iterationsstufe werden jeweils drei Detailkoeffizienten (horizontal, vertikal, diagonal) berechnet. Für die Auswertung wurde nun ein Merkmal-Satz extrahiert. Dieser Merkmal-Satz besteht aus Eigenschaften der Detailkoeffizienten, die im Folgenden explizit berechnet werden. Das erste berechnete Merkmal ist die Energie des Bildes [Liv, 1996]:

$$E_j^i = \frac{1}{MN} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N (D_j^i(m, n))^2 \quad (6.1)$$

wobei i die Transformationsebene und j die drei Detailkoeffizienten (horizontal, vertikal, diagonal) beschreibt. M, N gibt die Größe des Unterbildes an. Eine Eigenschaft dieses Merkmals ist jedoch, dass sie eine Orientierung beinhalten. Dies ist für den Anwendungszweck allerdings nicht zweckmäßig. Bildet man jedoch die Summe für eine Transformationsebene i , so entfällt diese Orientierung:

$$E_{tot}^i(m, n) = (D_1^i(m, n))^2 + (D_2^i(m, n))^2 + (D_3^i(m, n))^2 \quad (6.2)$$

Für eine Messung der Anisotropie der Energie kann folgendes Konzept angewendet werden (sei $(D_1^i(m, n))^2 = \epsilon_1^i$) [Liv, 1996]:

$$Orian^i(m, n) = \frac{1}{E_{tot}^i(m, n)} \sqrt{(\epsilon_1^i - \epsilon_2^i) + (\epsilon_1^i - \epsilon_3^i) + (\epsilon_2^i - \epsilon_3^i)} \quad (6.3)$$

Der resultierende Merkmal-Vektor wird somit berechnet mit:

$$E_{tot}^i = \frac{1}{MN} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N E_{tot}(m, n) \quad (6.4)$$

$$Orian^i = \frac{1}{MN} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N Orian(m, n) \quad (6.5)$$

Für eine DWT auf sechs Transformationsebenen ergibt sich ein Satz aus 12 Merkmalen. Zu diesen Merkmalen wird noch ein Weiteres hinzugenommen, der Mittelwert des normierten Originalbildes. Dieses Merkmal ist nicht rein morphologisch. Es detektiert vielmehr, wie viel „Material“ sich überhaupt auf dem jeweiligen Bild befindet. Aufgrund der Normierung stellt es jedoch keine Intensitätsmessung des Signals dar. Da bei Aufnahmen von arthrotischem Knorpelgewebe viele Defekte und Löcher erkennbar sind, ist dieses Merkmal sehr sensitiv für die gewünschte Klassifizierung. Der Merkmalraum der Analyse spannt somit einen 13-dimensionalen Vektorraum auf.

6.4.3 SOM Training

Die Eingabeschicht für die SOM besteht aus einer Punktwolke. Die Anzahl der Datenpunkte wird durch die Anzahl der in die Berechnung einfließenden Bilder bestimmt. Jeder Datenpunkt wird durch einen mehrdimensionalen Vektor repräsentiert. Die Anzahl der Dimensionen richtet sich nach dem von der Wavelet-Analyse aufgespannten Merkmalsraum. Nach der Initialisierung einer SOM und deren Training, wird der gesamte Datensatz durch die Referenzvektoren der Knotenpunkte der SOM bestimmt. Diese können nun in zwei Weisen dargestellt werden. Zum einen kann die Matrixstruktur der

SOM genutzt werden, um an jedem seiner Knotenpunkte eine Visualisierung des Referenzvektors einzufügen. Die Visualisierung kann z.B. ein Balkendiagramm mit N -Balken (wobei N die Dimension des Merkmalraumes ist) sein. Diese Methode wird vor allem bei großen Karten mit vielen Knotenpunkten und bei mehrdimensionalen Problemen unübersichtlich. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die SOM für jede Dimension separat darzustellen. Jede Karte enthält Informationen einer einzelnen Dimension in Form von z.B. Graustufenwerten, die den jeweiligen Wert des Merkmals am Knotenpunkt repräsentieren. Die entsprechend generierten Karten werden Komponentenkarten genannt. Die Gesamtinformation ist nicht mehr in einem einzelnen Diagramm untergebracht, jedoch lassen sich die Komponentenkarten leicht analysieren. Eine Darstellung dieses Visualisierungsprozesses ist in Abbildung 6.22 gezeigt.

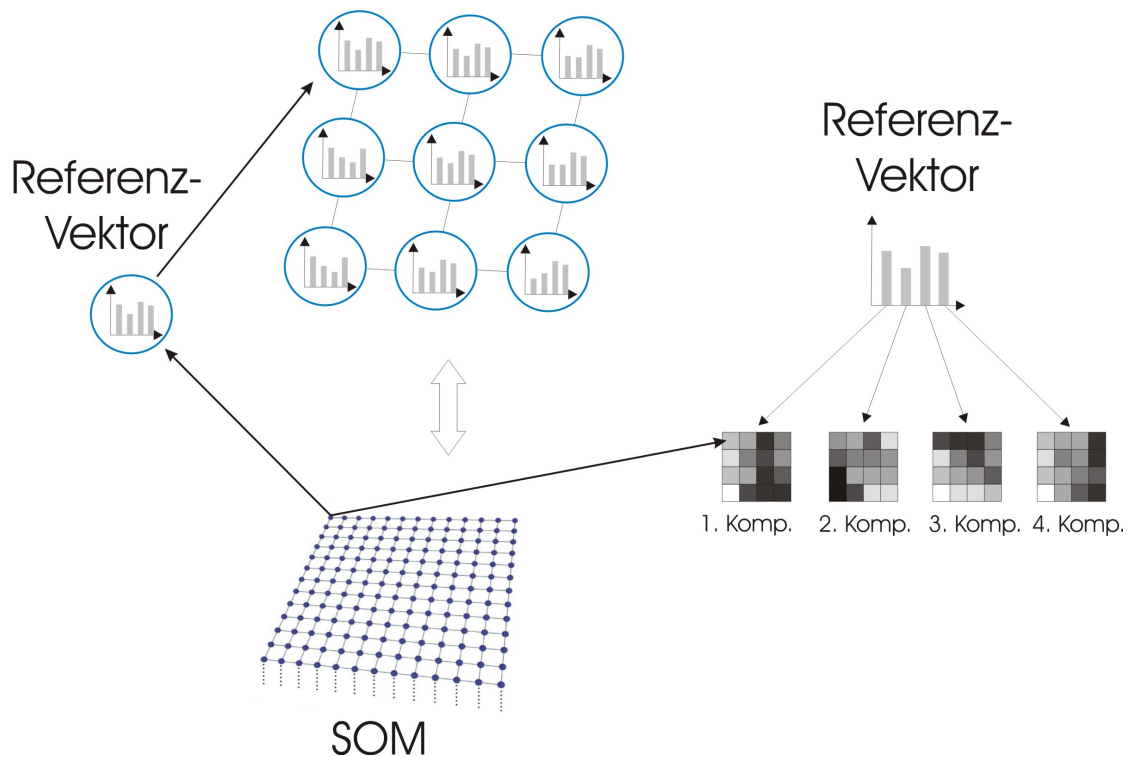


Abbildung 6.22: Prinzip der Darstellung von Referenzvektoren in Matrix und Komponentenkarten

Neben den Komponentenkarten hat sich eine weitere Darstellungsform etabliert, die sogenannte U-Matrix. Sie kann Einblicke in die lokalen Abstandsstrukturen von Daten geben, wie sie bei einer SOM vorkommen [Ult, 2003]. Eine U-Matrix stellt die Abstände benachbarter Knoten einer SOM dar. Auf diese Weise lassen sich Datenstrukturen wie

z.B. Clusterbildung erkennen und ermöglicht somit einen Informationsgewinn über den Datenraum. In Abbildung 6.23 wurde ein Datensatz mit drei Clustern aus insgesamt 300 Datenpunkten konstruiert. Das ursprüngliche SOM-Gitter wurde zufällig generiert. Nach dem Training der SOM in 500 Trainingsschritten zeigte sich, dass sich der Großteil der Knoten an den Clustern des Datensatzes befindet. Die auf diese SOM basierende U-Matrix zeigt die Clusterstruktur des Datensatzes deutlich. In den Regionen der Cluster sind die Abstände der Knotenpunkte sehr klein, in der Farbkodierung in blau dargestellt. Zwischen den Clustern sind sehr deutliche Grenzen mit sehr großen Abständen zwischen den Knotenpunkten anhand der gelben bis roten Farbkodierung erkennbar. Dieses Beispiel zeigt die Arbeitsweise einer U-Matrix Darstellung anhand eines 2-dimensionalen Datensatzes. Es wird deutlich, dass diese Darstellung nützliche Informationen über den Datensatz liefern kann, vor allem wenn der Datensatz mehrdimensional ist.

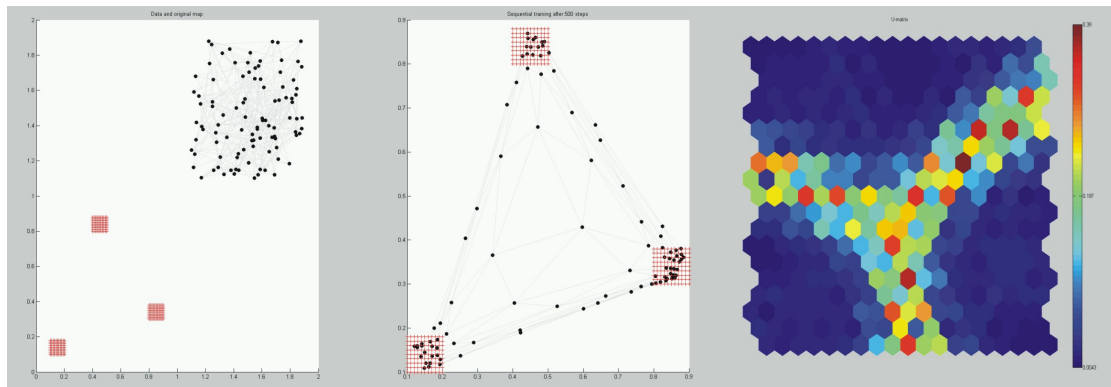


Abbildung 6.23: links: Datensatz mit 3 Clustern und zufällig generierter SOM; mitte: Trainierte SOM; rechts: U-Matrix der trainierten SOM

Ist der verwendete Datensatz hinreichend groß, entspricht jedem Knotenpunkt der SOM ein Cluster aus Merkmal-Vektoren. Durch das Zählen der Merkmal-Vektoren, die durch einen Referenzvektor bzw. einen Knotenpunkt der SOM repräsentiert werden, kann die Cluster-Struktur des analysierten Datensatzes repräsentiert werden. Diese Art der Darstellung wird auch „Hit-Statistik“ genannt. Je mehr Merkmal-Vektoren auf einen Knotenpunkt entfallen, umso größer wird dieser dargestellt. Dies ist in Abbildung 6.24 gezeigt. Ähnlich dem vorangegangenen Beispiel wurde ein Datensatz mit 350 Datenpunkten erzeugt. Die ersten 300 Datenpunkte entsprechen exakt den Clustern des Datensatzes der für die U-Matrix verwendet wurde, die restlichen 50 Datenpunkte wurden zufällig generiert. Erneut können sehr klar die drei Cluster in der Hit-Statistik nachgewiesen werden. Es haben sich in drei Raumgebieten sehr große Knotenpunkte gebildet, an denen vie-

le Merkmal-Vektoren zusammenfallen. In den Zwischenräumen gibt es fast überhaupt keine Treffer für die Knotenpunkte. Welche Knotenpunkte zu welchem Raumpunkt des Datensatzes gehören, kann anhand der Farbkodierung des SOM-Gitters erkannt werden. Die 50 zufällig verteilten Datenpunkte werden als vereinzelte Treffer („Hits“) in den Zwischenräumen der Cluster registriert. Darüber hinaus erkennt man in Abb. 6.24 noch eine weitere Anwendungsmöglichkeit dieser Darstellungsmethode. Es ist möglich, im Vorfeld der Auswertung eine Zuordnung der Ausgangsdaten zu bestimmten Farben vorzunehmen. In der gezeigten Darstellung wurden die gesamten Ausgangsdaten mit einem gleitenden Farbcode belegt. Es können jedoch auch einzelne Bilder oder auch Bildergruppen einfarbig markiert werden, sodass diese anhand des Farbcodes in der trainierten SOM später identifiziert werden können. Sie können sozusagen *getrackt* werden. Es ist jedoch stets eine vorherige Farbcodierung der Ausgangsdaten erforderlich.

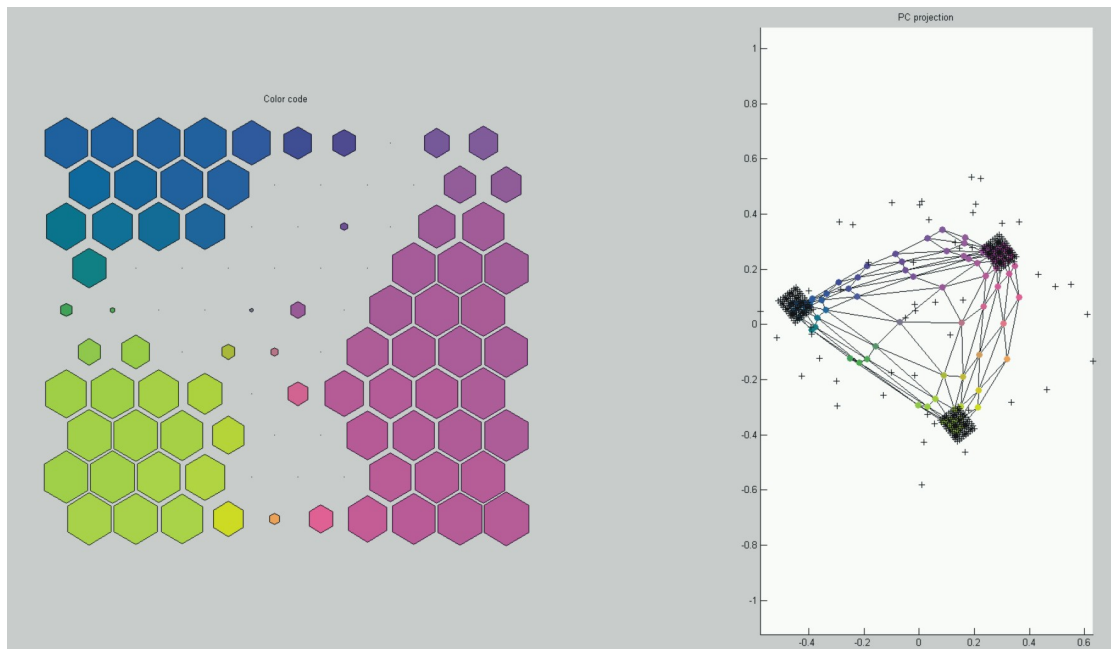


Abbildung 6.24: Die drei Cluster des Datensatzes sind in der Analyse deutlich erkennbar. links: Hit-Statistik rechts: Datensatz mit trainiertem SOM-Gitter. Für beide Darstellungen wurde zur besseren Visualisierung der gleiche gleitende Farbcode verwendet.

Analog zum Auffinden von Datenpunkten anhand der Farbkodierung kann auch das analysierte Bild, welches im Datenraum durch einen n-dimensionalen Merkmal-Vektor repräsentiert wird, an dem Knotenpunkt der SOM dargestellt werden, dessen Referenz-

vektor seinem Merkmal-Vektor am nächsten ist. Bei einer großen Anzahl an Datenpunkten können viele Merkmal-Vektoren auf einen Knotenpunkt entfallen. Da sich die Bilder aufgrund der Nähe ihrer Merkmal-Vektoren in den untersuchten Merkmalen jedoch ähnlich sehen sollten, kann ein repräsentatives Bild für den jeweiligen Knotenpunkt verwendet werden. Diese Art der SOM-Karten-Erstellung ist schematisch noch einmal in Abbildung 6.25 dargestellt.

6.5 Wavelet-Analyse von 2-Photonen Mikroskopaufnahmen von humanem Knorpelgewebe

6.5.1 Zwei-Kategorien Analyse

Die erste Analyse wurde mit einem Datensatz aus 66 Bildern durchgeführt. 33 dieser Bilder zeigen sehr gut erhaltenen Knorpel, die weiteren 33 Bilder zeigen arthrotischen Knorpel mit bereits teilweise zersetztem Knorpelgewebe. Die 33 Bilder jeder Gruppe bestehen wiederum aus drei unterschiedlichen Aufnahmen, die in elf unterschiedlichen Tiefen in axialer Richtung mit einem Abstand von einem μm aufgenommen wurden. Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Knorpelstrukturen, konnten die beiden Bildgruppen vor der Analyse in zwei Gruppen eingeteilt und farblich kodiert werden. In der Analyse werden die Bilder des gesunden Knorpels in grün, die Bilder des degenerierten Knorpels in rot dargestellt. Ziel dieser Analyse war, die beiden Bildgruppen auch anhand der Bildanalyse trennen zu können.

Zunächst wurden alle Bilder intensitätsnormiert. In der anschließenden Wavelet-Analyse wurden elf Merkmalsvektoren berechnet. Dies waren im Einzelnen der Mittelwert der normierten Bilder, die Energie $E_{tot}^{(1-6)}$ sowie $Orian^{(1-4)}$.

An den so gewonnenen, 11-dimensionalen Datensatz wurde eine SOM mit 98 Knotenpunkten trainiert. Die U-Matrix in 6.26 zeigt die Tendenz, dass die Daten der unteren Hälfte der Karte enger zusammen liegen als in der oberen Hälfte. Die Bilder im unteren Bereich besitzen somit ähnliche morphologische Eigenschaften. Ein kleiner Datenbereich in der rechten oberen Ecke der Karte liegt etwas von den anderen Daten entfernt. Aus der Komponentenkarte des ersten Merkmals lässt sich eine recht deutliche Zweiteilung der Karte erkennen. Die Variablen 3-5 erkennen die Daten am rechten oberen Rand der Karte gut.

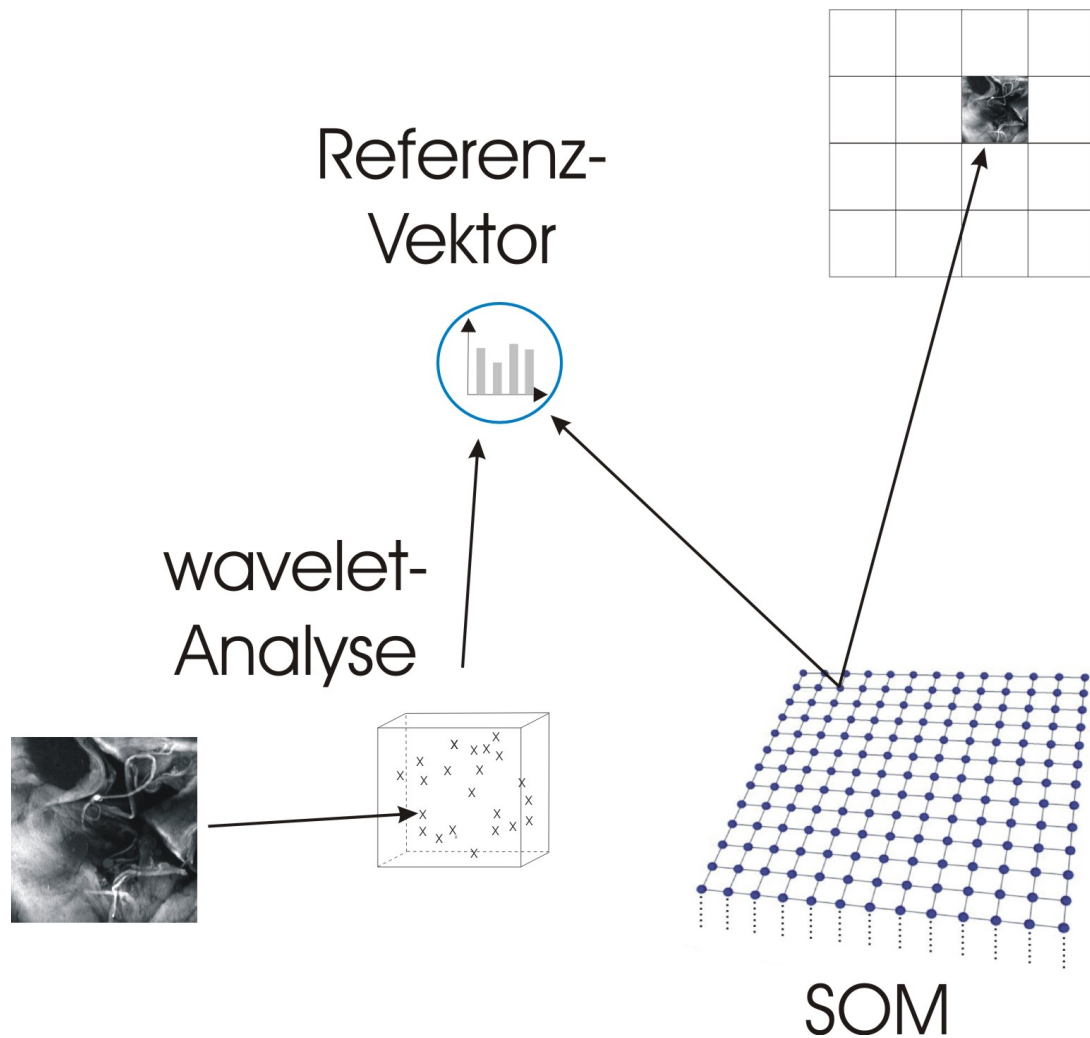


Abbildung 6.25: Das untersuchte Bild entspricht einem Datenpunkt im Merkmalsraum der Wavelet-Analyse. Die SOM wird an dem Datensatz trainiert, sodass der Merkmal-Vektor des Bildes seinem nächsten Referenz-Vektor auf der SOM zugeordnet wird. Das Bild kann am entsprechenden Knotenpunkt eingefügt werden.

Die Darstellung der Hauptkomponentenanalyse sowie die Hit-Statistik in 6.27 geben noch keine klare Auskunft über eine erfolgreiche Trennung der beiden Bildgruppen. Lediglich in der Hit-Statistik ist eine deutliche Grenze in der Mitte der Karte zu erkennen, der keine Bilder zugeordnet wurden. Ebenfalls in Ansätzen zu erkennen ist die leicht abgespaltene Bildgruppe in der rechten oberen Kartenregion. Diese ist auch in

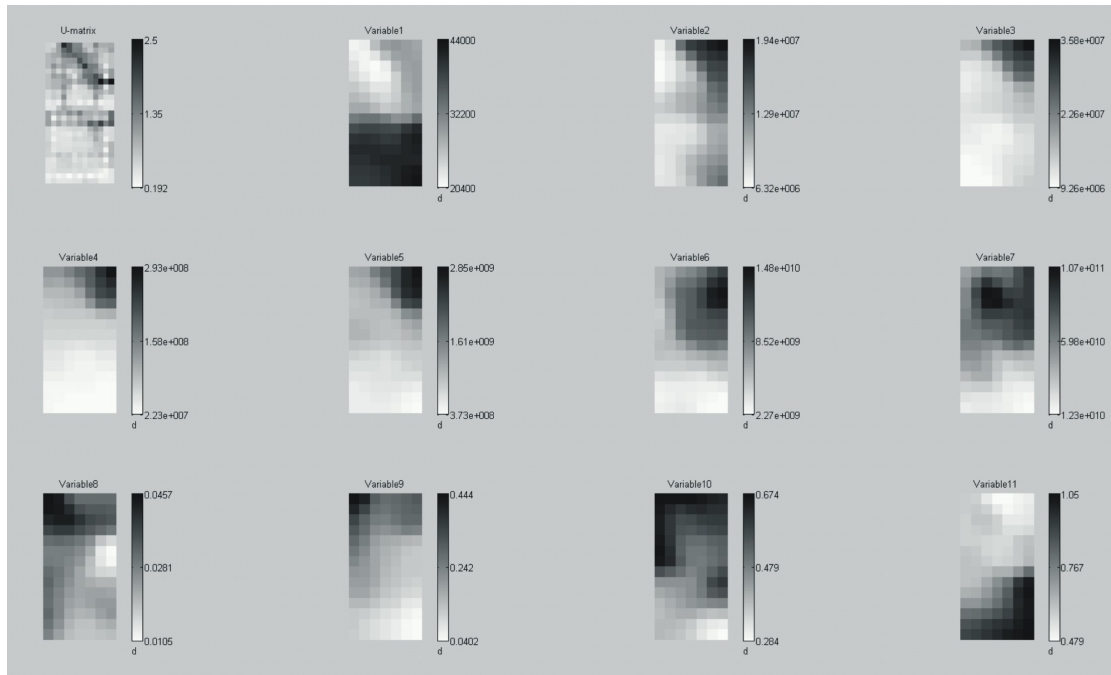


Abbildung 6.26: Auswertung des Testdatensatzes mit 66 Knorpelbildern. links oben: U-Matrix; danach: Komponentenkarten (1. Variable: Mittelwert Originalbild, 2.-7. Variable: $E_{tot}^{(1-6)}$, 8.-11. Variable: $Orian^{(1-4)}$)

der principal-component Analyse (in blau) zu identifizieren. Die barplane-Darstellung kann definitionsgemäß keine weiteren Erkenntnisse gegenüber den Komponentenkarten liefern. Die dort bereits gewonnenen und dokumentierten Erkenntnisse werden jedoch deutlich bestätigt.

Wie gut die Trennung der beiden Bildgruppen funktioniert hat, wird erst in der letzten Darstellung 6.28 deutlich. In dieser Darstellung handelt es sich genauso wie in 6.27 um eine Hit-Statistik, jedoch mit einer anderen Farbcodierung. Hier ist gezeigt, wo die vor der Analyse in rot und grün eingeteilten Bilder in der SOM landen. Das Ergebnis zeigt eine sehr klare Trennung der beiden Bildkategorien. Die in der ersten Hit-Statistik identifizierte Grenze entspricht exakt der hier ermittelten Grenze zwischen den beiden Kategorien. Außerdem wurden in 6.28 die Ursprungsbilder in die SOM eingefügt. An den Knotenpunkten, an denen mehrere Bilder zugeordnet wurden, ist eine Auswahl für ein einzelnes Bild getroffen worden. Mehrere Bilder sind immer an den Punkten zugeordnet, die auf der linken Seite in 6.28 mit einem größeren Quadrat eingezeichnet sind. Es sind mehrere freie Felder erkennbar. Dies liegt daran, dass das SOM-Gitter aus 98

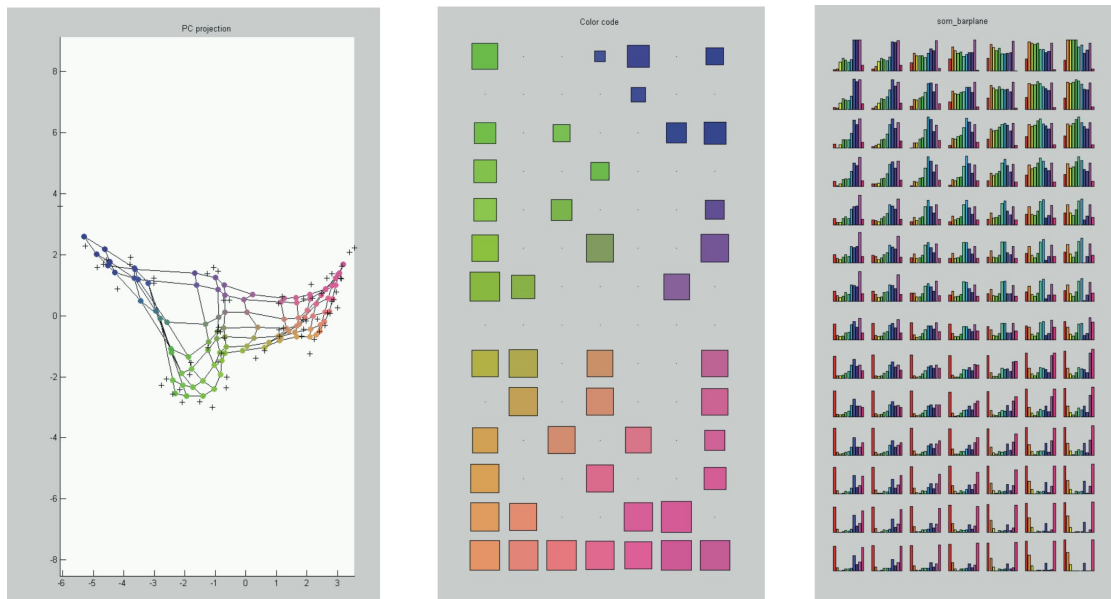


Abbildung 6.27: Weiterführende Darstellung der Analyse zu Abb. 6.26. links: principal-component Analyse, mitte: Hit-Statistik mit gleicher Farbkodierung wie PC-Analyse, rechts: barplane-Darstellung

(7×14) Knotenpunkten besteht, aber lediglich 66 Bilder für die Analyse verwendet wurden. Dieses Missverhältnis wurde in diesem Fall akzeptiert, da die Funktion der Analyse überprüft werden sollte. Die Darstellung ist mit dieser Darstellungswahl sehr prägnant und ändert im Kern der Analyse nichts an den Ergebnissen. In der oberen Hälfte ist zu erkennen, dass zwischen den drei einzelnen z-Stacks keine Vermischung stattfindet. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Texturen, werden sie von der Analyse getrennt. So können auch die etwas abgetrennten Bilder in der rechten oberen Ecke der Karte erklärt werden. Die untere Hälfte ist hingegen besser durchmischt. Allerdings sind die Bildunterschiede auch deutlich geringer. Dieses Verhalten wurde bereits anfangs anhand der U-Matrix festgestellt, da die Abstände der Knotenpunkte in dieser Region verhältnismäßig gering ausfielen.

6.5.2 Kategorisierung in die Outerbridge-Einteilung

Um die vorgestellte Analysemethode zur Kategorisierung einzusetzen, musste zunächst ein geeigneter Datensatz erstellt werden. Dazu wurden 31 verschiedene Bilderstapel mit jeweils 30 Einzelbildern mit einem μm Abstand in axialer Richtung aufgenommen. Die

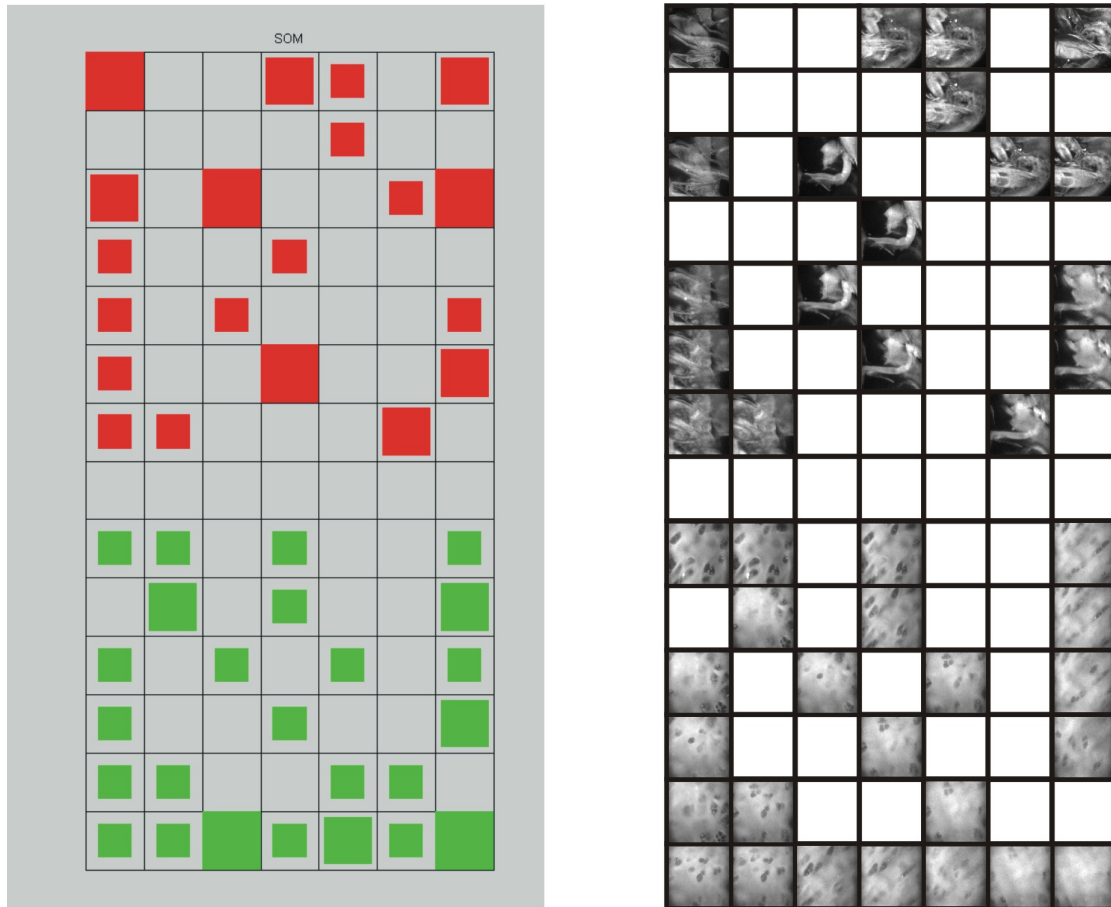


Abbildung 6.28: Diese Darstellung der Analyse des Testdatensatzes aus 66 Knorpelbildern zeigt eine Differenzierung in zwei Kategorien. links: Hit-Statistik mit rot-grüner Farbkodierung; rechts: SOM mit eingefügten Bildern

930 Einzelbilder des Datensatzes wurden entsprechend des Aufnahmefeldes zugeschnitten und intensitätsnormiert. Anschließend wurden die Bilder manuell kategorisiert. Die Kategorie wurde anhand des gesamten Datenstapels mit 30 Bildern bestimmt. Diese Einteilung beruht auf den gesammelten Erfahrungen mit den Knorpelbildern und erhebt keinen Anspruch auf vollständige Korrektheit. Einige Bilderstapel waren zudem nicht eindeutig zuzuordnen. Es wurde der bereits in 6.21 gezeigte Farbenkode verwendet. Es wurden 180 Bilder der ersten Kategorie (grün), 330 Bilder der zweiten Kategorie (gelb), 210 Bilder der dritten Kategorie (blau) und 210 Bilder der vierten Kategorie (rot) zugeordnet. Die Aufnahmeparameter des non-descanned Kamera-Detektionsmodus waren

für jede Aufnahme identisch. Der Datensatz beinhaltet eine große Anzahl an Bildern und deckt ein sehr großes Spektrum an Knorpelzuständen ab.

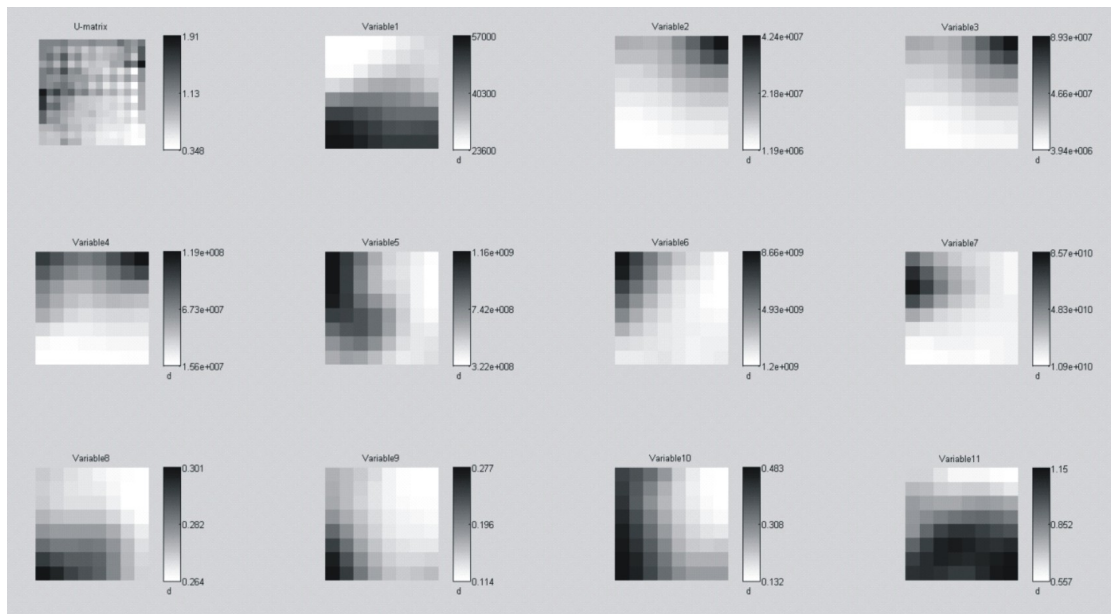


Abbildung 6.29: Darstellung der Analyse eines großen Datensatzes aus Knorpelbildern. links oben: U-Matrix; danach: Komponentenkarten (1. Variable: Mittelwert Originalbild, 2.-7. Variable: $E_{tot}^{(1-6)}$, 8.-11. Variable: $Orian^{(1-4)}$)

Die Analyse wurde analog zur vorangegangenen Analyse mit den gleichen Merkmal-Vektoren durchgeführt. Anschließend wurde eine SOM mit 64 Knotenpunkten erstellt, die in 300 Trainingsschritten an die Daten trainiert wurde. Der große Datensatz erforderte eine Rechenzeit von einigen Minuten. Die erste Darstellungsform der Analyse ist erneut die U-Matrix sowie die Komponentenkarten 6.29. Die U-Matrix zeigt vor allem in der rechten unteren Ecke der SOM kleine Abstände der Knotenpunkte. Es gibt keine Bereiche, die deutlich abgetrennt sind, die Übergänge sind fließend. Gründe hierfür sind in der großen Anzahl an Bildern sowie den kleinen Kartendimensionen zu finden.

Die Hit-Statistik sowie die Hauptkomponentenanalyse in 6.30 führt zu den gleichen Erkenntnissen. In der rechten unteren Ecke der SOM sind viele Bilder den einzelnen Knotenpunkten zugeordnet, dieser Bereich ist in der Hauptkomponentenanalyse anhand der Farbkodierung leicht zu erkennen. Es sind zwei Knotenpunkte am linken Rand der SOM zu erkennen, die für kaum einen bzw. keinen Eingabevektor die größte Übereinstimmung lieferte und somit auch kein Bild zugeordnet wurde. Aufgrund der Untersuchung der

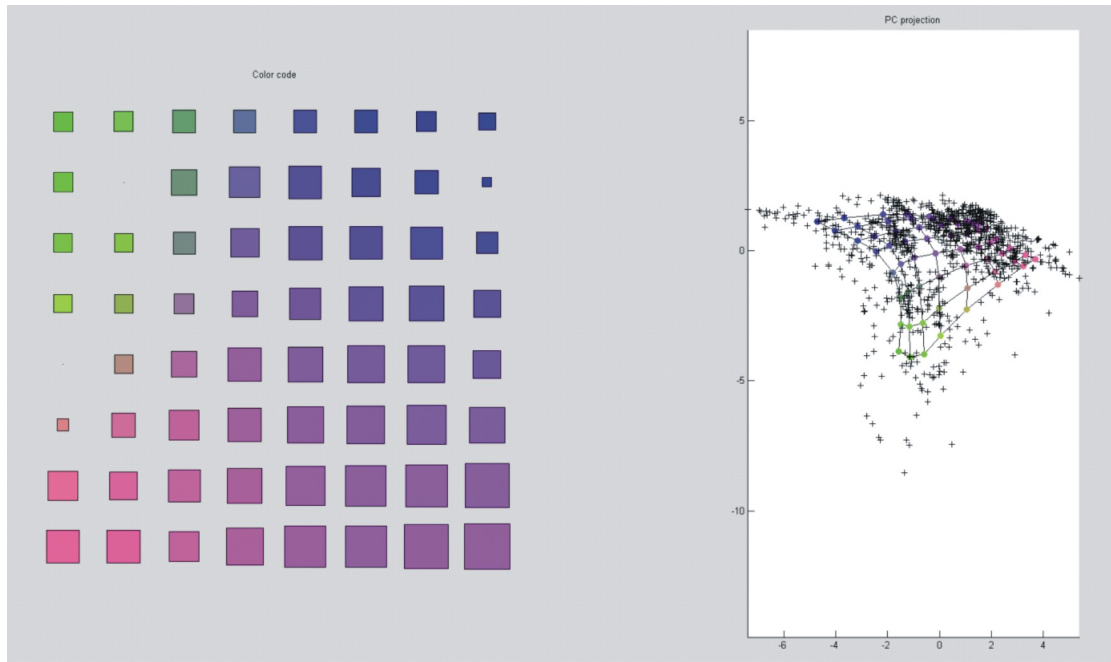


Abbildung 6.30: In dieser Darstellung des großen Datensatzes sind noch keine einzelnen Cluster erkennbar. links: Hit-Statistik; rechts: PCA mit entsprechender Farbkodierung

SOM wurde festgestellt, dass dem Knotenpunkt (2,2) der SOM kein Bild zugeordnet wurde.

Aus der ersten Analyse wurde die Erkenntnis gewonnen, dass vor allem die Darstellung einer Hit-Statistik mit der Farbkodierung der einzelnen Kategorien sowie die Zuordnung der Originalbilder zu den Knotenpunkten der SOM sehr viel Aussagekraft besitzen. Die Hit-Statistik 6.30 hat gezeigt, dass der Knotenpunkt (2,2) mit keinem Bild belegt ist. Aus diesem Grund wurde eine Variante der Hit-Statistik eingeführt 6.31, damit diesem Knotenpunkt eine Kategorie zugeordnet werden kann. Bei dieser Variante der Hit-Statistik wird die Summe der umliegenden Knotenpunkte mit in die Statistik einbezogen. Somit kann dem Knotenpunkt ohne zugeordnetem Bild eine Kategorie zugeordnet werden. Eine Folge dieser Berechnungsmethode ist die größere Ausbreitung der einzelnen Kategorien über die Karte. So ist die Kategorie 2 (gelb) fast über die gesamte Karte ausgebreitet, lediglich die linke obere Ecke besitzt keine Hits. Für die Kategorisierung hat diese Eigenschaft jedoch keine negativen Auswirkungen. Die Gebiete, in denen eine Kategorie die meisten Hits verzeichnet, dominiert auch weiterhin noch die gleiche Kategorie die

entsprechenden Knotenpunkte. Für jeden Knotenpunkt der Karte kann eine Kategorie berechnet werden, die die meisten Hits verzeichnet.

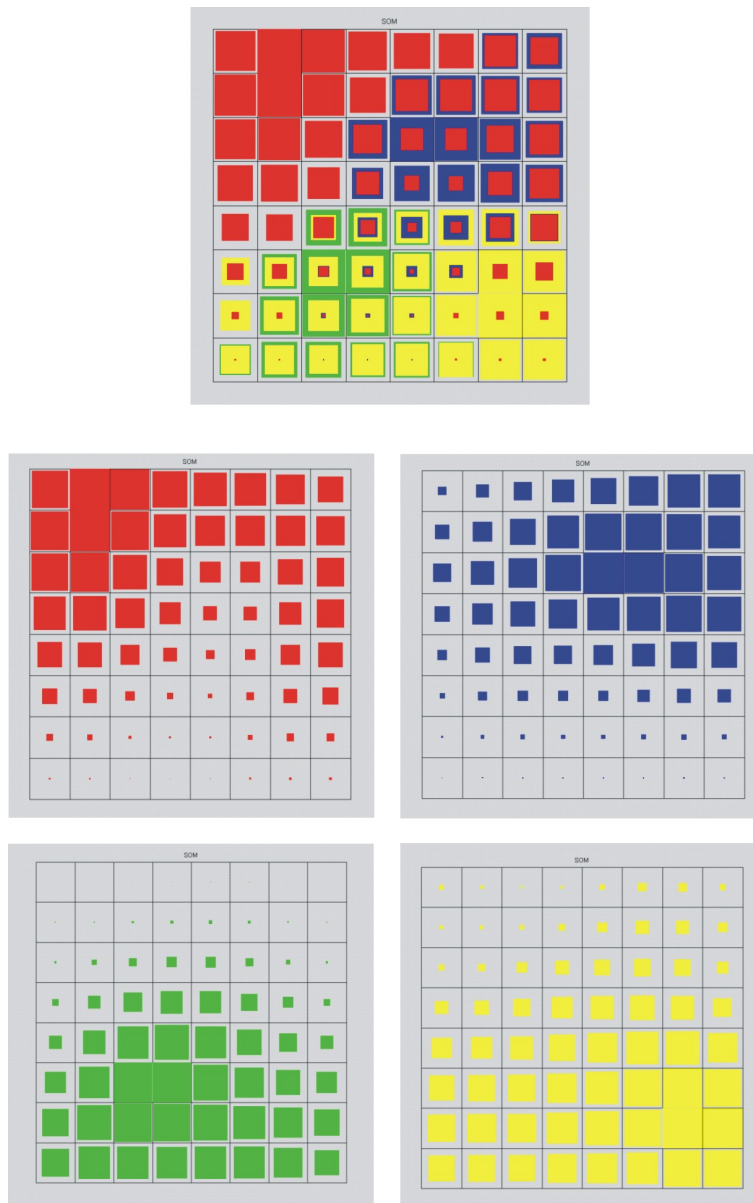


Abbildung 6.31: In der dargestellten Hit-Statistik des großen Datensatzes werden vier Kategorien deutlich, die Summe der Hits der umgebenden Knotenpunkte wird mit einbezogen. oben: Darstellung aller Kategorien, unten: separate Darstellung der einzelnen Kategorien. Kat. 1 grün, Kat. 2 gelb, Kat. 3 blau und Kat. 4 rot.

In der oberen Darstellung in Abb. 6.31 ist die „Gewinner-Kategorie“ an der Farbkodierung des äußeren Randes eines Bildes zu erkennen. Die Gewinner-Kategorie wurde in 6.32 zusammen mit einem zufällig für den jeweiligen Knotenpunkt ausgewählten Bild dargestellt. An dieser Darstellung wird besonders deutlich, wie gut die Kategorisierung der Karte funktioniert. Die Karte kann in vier Bereiche eingeteilt werden, in denen jeweils eine andere Kategorie dominiert. In der linken unteren Ecke der Karte befinden sich Bilder der ersten Knorpelkategorie (grün), in der rechten unteren Ecke die zweite (gelb), in der rechten oberen Ecke die dritte (blau) und schließlich in der linken oberen Ecke die vierte Kategorie in roter Farbkodierung. Lediglich zwei Knotenpunkte am linken unteren Rand wurden von einer anderen Kategorie (gelb) gewonnen als ihre Umgebung (grün). Werden die Bilder an diesen Punkten betrachtet, stellt man fest, dass diese zu ihrer Umgebung passen. Es sind sehr helle Bilder mit hoher Intensität. Des Weiteren sind runde Strukturen erkennbar, die aus der Auflage der Knorpelprobe auf dem Objektträger des Mikroskops zurückzuführen sind. Dabei handelt es sich um kleine Bläschen. Sie entstehen durch das destillierte Wasser, das zur Befeuchtung der Probe und zum Brechungsindex-Matching verwendet wird. Der Knorpelzustand dieser Proben ist, nach der Beurteilung der Fluoreszenzaufnahmen, sehr gut. In der manuellen Analyse, auf die die Farbkodierung basiert, wurden die Proben aufgrund eines schlechteren Zustandes in tieferen Schichten der zweiten Kategorie anstatt der ersten zugeordnet. Der Grenzbereich zwischen dem grünen und dem gelben Bereich (5. Spalte von links) wird jeweils nur sehr knapp von der ersten Kategorie gewonnen (Abb. 6.31). Bilder in diesem Bereich der Karte können somit zu beiden Kategorien zugeordnet werden.

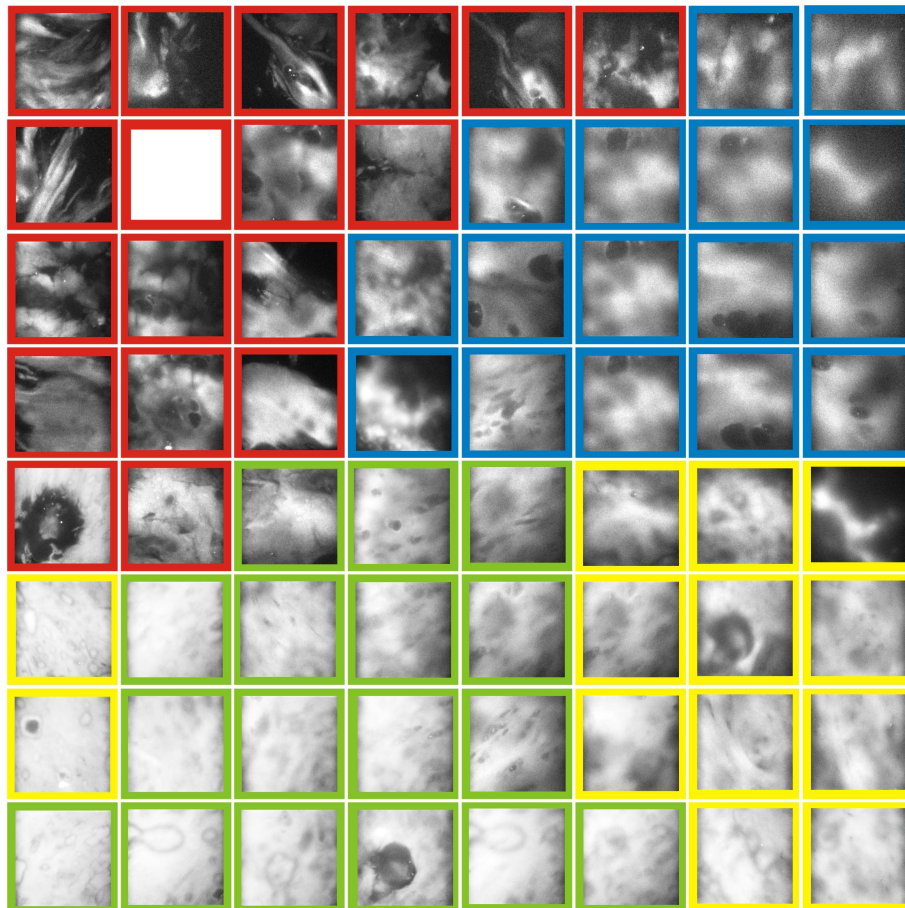


Abbildung 6.32: SOM mit eingeordneten Originalbildern. Die farbliche Umrandung entspricht der „Gewinner-Kategorie“

6.5.3 Vergleich mit makroskopischer Kategorisierung

Bisher wurden die 2-Photonen-Ausnahmen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften kategorisiert. Eine Kontrolle bzw. eine Referenz stellte die subjektive Bewertung dieser Bilder dar. Ziel der Kategorisierung ist, den makroskopisch gewonnen Eindruck vom Knorpelzustand in der Kategorisierung der 2-Photonenbilder wiederzufinden. Ein auftretendes Problem wird bereits in der Wortbezeichnung der Bilder deutlich. Der makroskopische Eindruck einer Knorpelprobe bezieht sich auf einen deutlich größeren Beurteilungsbereich als die Mikroskopaufnahmen. Aufgrund von Inhomogenitäten innerhalb der Knorpelproben ist deshalb zu erwarten, dass nicht alle Mikroskopaufnahmen der gleichen Kategorie zugeordnet werden wie es makroskopisch der Fall ist. Darüber hinaus ist es möglich, dass gewisse Anzeichen von Veränderungen im mikroskopischen Maßstab deutlich eher entdeckt werden können als im makroskopischen Maßstab. Es ist z.B. zu erwarten, dass die ersten Auffaserungen der Oberfläche als mikroskopisches Phänomen in den Mikroskopaufnahmen zu einem früheren Zeitpunkt entdeckt werden können als bei der Betrachtung des gesamten Knorpels. Es ist zu erwarten, dass die Mehrzahl der Knorpelaufnahmen sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch der gleichen Kategorie zugeordnet wird. Ebenso sind einzelne Mikroskopaufnahmen in einer benachbarten Kategorie zu erwarten.

Kategorie	Kat. 1	Kat. 2	Kat. 3	Kat. 4	Übereinstimmung mit Makro
Kategorie 1	15	1	0	0	94%
Kategorie 2	3	4	1	0	40%
Kategorie 3	0	0	5	2	71%
Kategorie 4	0	0	1	9	90%

Tabelle 6.3: linke Spalte: makroskopische Einteilung, folgende Spalten: automatisierte Einteilung der 2-Photonen-Aufnahmen, letzte Spalte: Übereinstimmung der Kategorisierungsmethoden

Um den beschriebenen Vergleich durchführen zu können, sollten die Knorpelproben vom operierenden Orthopäden Dr. Dickob bewertet werden. Aufgrund der teilweise deutlichen Zustandsschwankungen innerhalb einzelner Knorpelproben sollten bestimmte Bereiche auf der Probe markiert werden. Dieses Verfahren ließ sich allerdings aufgrund fehlender Markierungsmöglichkeiten nicht befriedigend realisieren. Somit wurden die Proben vor der Aufnahme mit dem 2-Photonen Mikroskop fotografiert. Der vermessene Bereich wurde auf den Fotos dokumentiert. Diese Bereiche konnten anschließend anhand der

Fotos ausgewertet werden. Zwar konnten die vermessenen Bereiche nicht scharf abgegrenzt werden, jedoch konnte der Bereich der Probe hinreichend erfasst werden. Für den Vergleich wurden Fluoreszenzbilder in einer Aufnahmetiefe von $15\mu\text{m}$ ausgewählt. Sie wurden mit Hilfe einer kleinen Hit-Statistik auf der Karte identifiziert und der Kategorie zugeordnet, die den entsprechenden Knotenpunkt in der vorangegangenen Analyse mit 930 Testbildern gewonnen hat. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst. Einen Auszug der Auswertung in Form von kleinen Hit-Statistiken mit entsprechenden Fotos des Knorpels ist in Abbildung 6.33 gezeigt. Leider wurden nicht alle Knorpelproben auch fotografisch dokumentiert. Somit lässt der bestehende Datensatz derzeit noch keine Analyse mit größeren Datenmengen zu. Mehrere axiale Ebenen in diese Analyse mit einzubeziehen erscheint an dieser Stelle nicht sinnvoll um die Datenmenge zu erhöhen.

Die Ergebnisse dieser Tabelle entsprechen den erwarteten Ergebnissen. Einzig die Kategorie 2 weist mit 40% nur wenig Übereinstimmung mit der makroskopischen Bewertung auf. Bei genauerer Betrachtung der Hit-Statistik für diese Kategorie fällt jedoch auf, dass einige Bilder genau in der Grenzregion zwischen der 1. und 2. Kategorie angeordnet sind. Zudem wurde bereits festgestellt, dass die Bilder gerade in dieser Grenzregion sehr ähnlich sind und eine scharfe Kategorisierung nicht möglich ist. Somit kann der geringe Übereinstimmungswert begründet werden.

Insgesamt verlief die Überprüfung der Kategorisierung mit Hilfe der makroskopischen Befunde positiv.

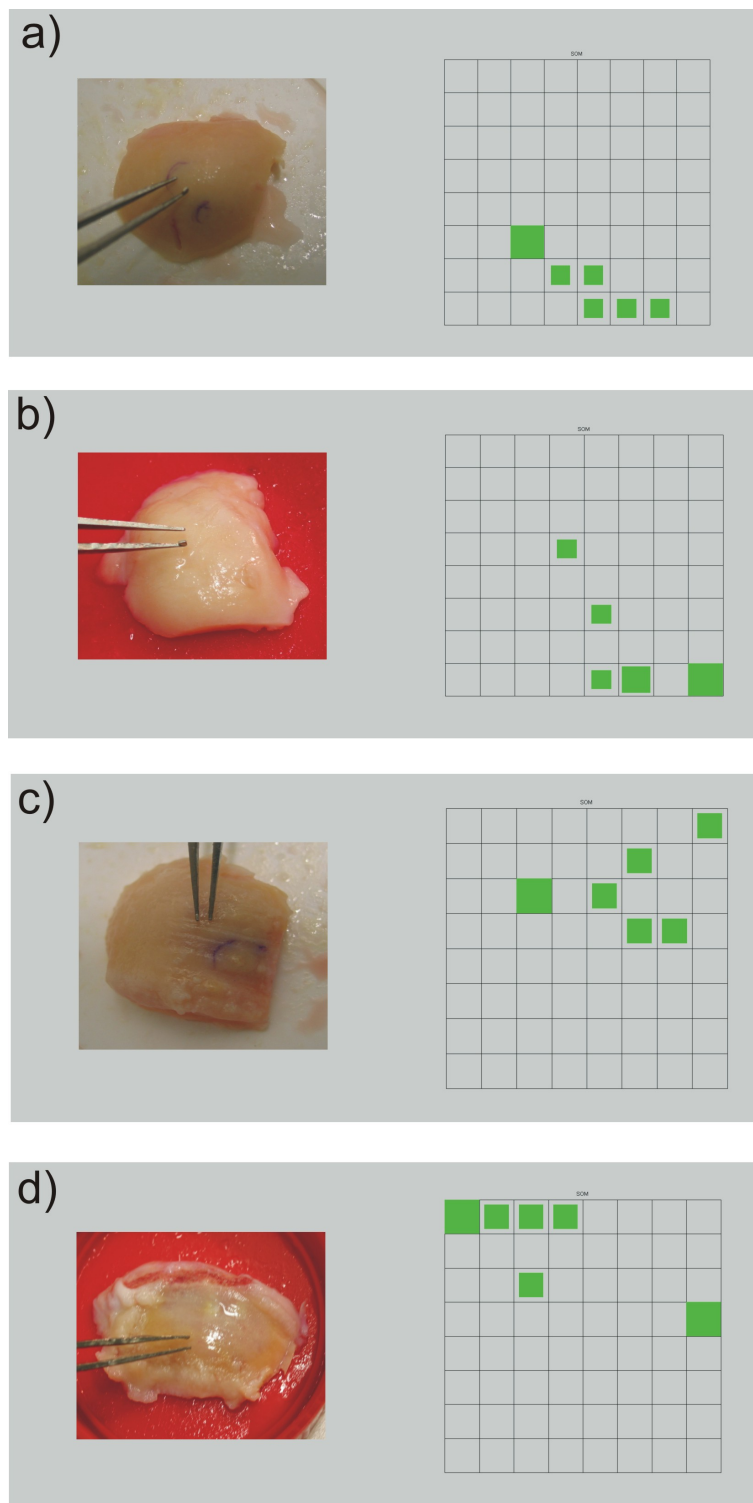


Abbildung 6.33: Hit-Statistiken mit makroskopischen Vergleichsbildern

7 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur objektiven Beurteilung und Klassifizierung von humanem Knorpelgewebe etabliert werden. Weiterhin sollte die Bildgebung vom ortsfesten Mikroskopstativ hin zu einer beweglichen, endoskopischen Mikroskopieeinheit verlagert werden um einen Schritt in die Richtung einer medizinischen Anwendung zu vollführen. Dazu wurde ein Prototyp in den bereits bestehenden 2-Photonen-Mikroskopaufbau integriert. Es ist stets eine Umbauarbeit zu leisten, um zwischen dem endoskopischen und dem nicht-endoskopischen Aufnahmemodus zu wechseln. Diese Erweiterung des bestehenden Aufbaus wurde bereits so ausgelegt, dass ein Umbau möglich ist. Mit einem moderaten Justieraufwand kann zwischen beiden Methoden gewechselt werden. Mit dem endoskopischen Aufbau konnten verschiedene Proben erfolgreich aufgenommen werden, wobei menschliches bzw. tierisches Knorpelgewebe nur ein sehr schwaches Signal erzeugen konnte.

Gründe für ein schwächeres Signal bzw. ein kontrastärmeres Bild sind in verschiedenen Parametern zu suchen. Hier sind die Anregungsintensität, die Pulsdauer und die geringere numerische Apertur des GRIN-Linsen Objektivs zu nennen. Die Ausgangsleistung des Ti:Sa-Oszillators beträgt ca. 1,2 W. Nachdem der Strahl den Gitterkompressor durchlaufen hat, beträgt die Leistung lediglich noch ca. 130 mW. Mit dieser Leistung wird in das TriM-Scope eingekoppelt und schließlich über das Mikroskop in das Faserbündel fokussiert. Am Ende des Faserbündels wurden Leistungen von bis zu 20 mW gemessen. Diese Leistung würde bei direkter Detektion und einer hohen numerischen Apertur des Objektivs sicherlich für die angestrebte Anwendung ausreichen. Da jedoch die Detektion ebenfalls über das Faserbündel erfolgt, erleidet das Signal bei der Detektion erneut starke Verluste. Es bestehen jedoch noch einige Verbesserungsmöglichkeiten des Aufbaus. Zunächst könnte auf das TriM-Scope im Aufbau verzichtet werden. Für den endoskopischen Aufbau werden effektiv lediglich die beiden Galvo-Scanspiegel genutzt. Die Intensitätsmodulation, der Prismenkompressor sowie der Beam-Multiplexer werden für diese Anwendung nicht genutzt, sodass ein deutlicher Intensitätsgewinn ohne

das TriM-Scope möglich wäre. Eine Scaneinheit aus zwei galvanischen Scanspiegeln ist in diesem Fall ausreichend um danach den Laser in das Mikroskop und somit das Faserbündel einzukoppeln. Bei einer Ausgangsleistung von 130 mW aus dem Gitterkompressor sollte eine Leistung von ca. 50-60 mW im Fokus des GRIN-Linsen-Objektivs möglich sein. Es wird erwartet, dass diese Leistung für ein deutlich besseres Signal sorgen würde. Desweiteren könnte die gesteigerte Laserintensität dazu führen, dass die Pulslänge mit Hilfe des Autokorrektors vermessen werden kann. Der divergierende Strahl nach dem GRIN-Objektiv muss zur zeitlichen Vermessung des Pulses zunächst mit Hilfe eines weiteren Objektivs parallelisiert werden, um anschließend in einen Autokorrektor eingekoppelt zu werden. Mit der bisherigen Intensität war eine Messung der Pulslänge nicht mehr möglich. Dies sollte mit einer höheren Intensität möglich sein um somit den Gitterkompressor exakt auf das Minimum der Pulslänge justieren zu können. Dies geschah bisher anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals. Diese Methode war jedoch mit einem sehr großen Fehler behaftet.

Von der medizinischen Seite gibt es in Person von Dr. Dickob den Wunsch, die Eindringtiefe in das Knorpelgewebe zu erhöhen. Dieses Ziel kann wiederum nur durch eine deutliche Erhöhung der Laserintensität erreicht werden. Für eine, aus medizinischer Sicht, ausreichende Eindringtiefe muss eventuell ein neues Konzept für das Mikroendoskop verwirklicht werden. Der Einsatz einer bewegten single-mode Faser bzw. einer PCF¹ könnten zu der gewünschten Intensität führen. Allerdings ist der Einsatz dieser Methode nicht ohne das Know-How von externen Partnern möglich. Die Ansteuerung einer bewegten Faserspitze in der gewünschten miniaturisierten Ausführung ist mit den derzeitigen Mitteln und Wissen nicht möglich. Hier wären Kooperationen mit anderen Forschungseinrichtungen und Industrieunternehmen anzustreben. Jedoch wird eine Eindringtiefe von 500 μm nicht überschritten werden können. Um Informationen auf größeren Tiefen des Knorpels erhalten zu können, ist eine Kombination mit einem OCT denkbar. Diese Technik bietet sich aufgrund der gleichen Anforderungen an die Strahlquelle an. Allerdings erhöht eine derartige Erweiterung die Komplexität des Systems deutlich. Mit Blick auf die Kosten eines klinischen Endgerätes ist die Verwendung eines Ti:Sa-Lasers nicht die optimale Lösung. Hier ist auf die schnell fortschreitende Laserentwicklung zu hoffen. Es sind derzeit erste femtosekunden Faserlaser-Systeme auf dem Markt, die deutlich preisgünstiger sind als ein Ti:Sa-Laser (z.B. Er:doped fiber laser 780 nm, 100-120 fs, >65 mW, Repetitionsrate 100 MHz, Firma Menlo Systems). Bei steigender Ausgangsleistung werden diese Systeme sicherlich für die endoskopische Anwendung interessant

¹photonic crystal fiber - PCF

und praktikabel.

Neben den Erweiterungen bzw. Verbesserungen im Aufbau kann auch die Auswertemethode noch weiter optimiert werden. Eine andere Auswahl der verwendeten Merkmale für die Wavelet-Analyse ist denkbar. Für die spätere Verwendung der Erfindung wäre es notwendig, einen Standard-Datensatz festzulegen, der sämtliche Stadien der Arthrose enthält. Dieser Datensatz müsste mit der vorhandenen Auswertemethode analysiert werden und in Kategorien eingeteilt werden, analog zur Vorgehensweise in dieser Arbeit.

In der klinischen Anwendung erstellt der behandelnde Arzt ein mikroendoskopisches Bild, welches anschließend analysiert und ausgewertet wird. Das Bild wird somit an einen bestimmten Punkt im multidimensionalen Merkmalraum einsortiert. Um die Aufnahme nun der richtigen Kategorie zuzuordnen, kann die sogenannte *k-nearest-neighbor*-Methode (k-nn Methode) angewandt werden. Diese berechnet die *k* nächsten Nachbarpunkte z.B. mittels der euklidischen Distanz des Standarddatensatzes. Sind diese Nachbarpunkte bestimmt, wird die Kategorie dieser Punkte ermittelt. Da ähnliche Bilder, bzw. Bilder mit ähnlichen Bildmerkmalen im n-dimensionalen Merkmalraum eng zusammenliegen, liegen auch die Bilder der gleichen Knorpelkategorie eng beieinander. Gehören die *k* nächsten Nachbarn zu einer bestimmten Kategorie, wird auch das neu aufgenommene Bild zu dieser Kategorie gehören. Dies könnte im Endprodukt so gelöst werden, dass eine entsprechende Zahl oder Lampe aufleuchtet, die die entsprechende Kategorie symbolisiert.

Der behandelnde Arzt hat somit gleich mehrere subjektive sowie objektive Beurteilungsgrundlagen. Bei der Erstellung des endoskopischen Bildes kann zusätzlich der sogenannte Tasthaken verwendet werden. Mit diesem Instrument wird mechanisch Druck auf den Knorpel ausgeübt um die Elastizität des Knorpels beurteilen zu können. Dieser Test ist sehr stark von der individuellen Erfahrung des behandelnden Arztes abhängig. Mit der vorgestellten Methode kann der Arzt auf ein zusätzliches bildgebendes Verfahren zurückgreifen. Zum einen kann sich der Arzt das 2-Photonen-Fluoreszenzbild nach seinem persönlichen Erfahrungsschatz analysieren, zum anderen kann er sich auf das objektiv ermittelte Ergebnis der Auswerteanalyse stützen. Das Faserbündel kann mit seinen geringen Ausmaßen in einen freien Kanal eines herkömmlichen Endoskops integriert werden. Es muss kein zusätzlicher, invasiver Eingriff am Patienten durchgeführt werden. Es genügt der minimal-invasive Eingriff einer Endoskopie.

Neben diesem individuell auf den Einsatz für humanes Knorpelgewebe ausgerichteten Aufbau kann das 2-Photonen-Mikroskop für diverse Forschungen angewendet werden.

Ein besonderer Forschungszweig ist in den Bereich der Molekularbiologie anzusiedeln. In diesem Anwendungsfeld wurde das Mikroskop auch während dieser Arbeit intensiv angewendet. Hierbei stand die räumliche und zeitliche Verteilung von Proteinen (z.B. HMG Proteine) in pflanzlichen Protoplasten-Zellen im Vordergrund. Neben der intrazellulären Proteindynamik wäre auch die Messung interzellulärer Proteindynamiken möglich. Es konnten bis zum Abschluss dieser Arbeit jedoch noch keine transfizierten Keimlinge hergestellt werden. Diese Keimlinge hätten die Besonderheit, dass in allen Zellen der Fluoreszenzfarbstoff (pa-)GFP eingebaut ist. Nach Aktivierung des Moleküls in einer beliebigen Zelle wären Messungen von interzellulären Transportprozessen innerhalb der Pflanze möglich.

Die große Variabilität des Aufbaus des 2-Photonen-Mikroskops bietet die Möglichkeit zu weiteren vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten. So konnte z.B. auch die Penetration von Nanopartikeln in Lugen-Epithelzellen verfolgt werden. Vor allem der Einsatz der immer häufiger untersuchten Nanopartikeln könnte ein neues Einsatzgebiet sein. In diesem Zusammenhang ist eine Kombination eines Rastraftmikroskops (AFM) mit dem 2-Photonen-Mikroskop denkbar. Vor allem die sehr ausgeprägten Kenntnisse der Arbeitsgruppe der experimentellen Biophysik an der Universität Bielefeld im Bereich der Rasterkraftmikroskopie könnte hier sehr zum Vorteil sein.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 2-Photonenmikroskop mit multiplen Detektionsmethoden betrieben und für verschiedene Anwendungen verwendet und ausgebaut.

Mit den vorgestellten non-descanned Detektionsmethoden können dreidimensionale Intensitätsaufnahmen erstellt werden. Die Detektion mit der EMCCD-Kamera bietet den Vorteil der Verwendung von multiplen Anregungsfoki und somit einer hohen Aufnahmegeschwindigkeit. Die Detektion mit einem PMT ist hingegen auf einen Anregungsfokus beschränkt, erzielt jedoch ein besseres S/N-Verhältnis. Vor allem bei einer großen Eindringtiefe in stark streuenden Proben ist diese Detektionsmethode zu bevorzugen.

Eine spektrale Auswertung des Fluoreszenzsignals kann durch die selektive Verwendung von Bandpassfiltern im Detektionspfad sowohl mit der Kamera als auch mit dem PMT durchgeführt werden. Die lange Aufnahmezeit bei der Verwendung des PMT kann zu Zerstörungsmechanismen in der Probe sowie zum Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs führen. Deutlich zeiteffizienter ist die multifokale, multispektrale descanned Detektionsmethode. Mit dieser Methode werden acht Bilderstapel gleichzeitig aufgenommen, die jeweils aus acht spektralen Kanälen bestehen. Allerdings erfordert diese Detektion eine anschließende, externe Bildverarbeitung. Gegenüber der non-descanned Kameradetektion wird ein höheres S/N-Verhältnis erreicht. Die zusätzlich detektierte, spektrale Information wird dazu genutzt, Fluorophore voneinander zu unterscheiden und somit individuell markierte oder autofluoreszierende Kompartimente einer Probe zu unterscheiden.

Eine weitere Möglichkeit der Unterscheidung von Fluorophoren ist die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauer. Mit dem installierten TCSPC-System ist es möglich, Fluoreszenz-Lebenszeit-Imaging durchzuführen.

Die beiden Hauptanwendungen des Systems waren die Bewertung von humanem Knorpelgewebe sowie die Untersuchung von Proteindynamiken in Pflanzenzellen.

Humanes Knorpelgewebe kann mittels 2-Photonen Mikroskopie analysiert werden. Sowohl die extrazelluläre Matrix als auch die in der Matrix eingebetteten Chondrozyten

erzeugen ein Fluoreszenzsignal. Eine Differenzierung der extrazellulären Matrix gegenüber den Zellen wurde über die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren sowie über die unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern gezeigt. Die zentrale Fragestellung war die Klassifizierung von Knorpelgewebe in bestehende Bewertungsschemata für Arthrostadien anhand von 2-Photonen Fluoreszenzaufnahmen. In diesem Zusammenhang konnte die Fluoreszenzintensität als ein charakteristischer Parameter für die Knorpeldegeneration identifiziert werden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Morphologie der Mikroskopbilder den makroskopischen, klinischen Befunden sehr ähneln. Um eine automatisierte, objektive Klassifizierung zu erzielen, wurde eine Analyse der Bildtexturen angewendet. Diese beruht auf der Erzeugung von mehrdimensionalen Merkmalsräumen mittels diskreter Wavelet-Transformation. Die Auswertung dieser Merkmale erfolgte mit selbstorganisierenden Karten. Auf diese Weise konnte eine Klassifizierung in vier Arthrostadien erzielt werden, die in bisherigen Vergleichen zu makroskopischen Befunden sehr gut übereinstimmt. Um die Anwendung der Knorpelklassifizierung weiter in die Richtung der klinischen Anwendung zu bringen, wurde zudem ein mikroendoskopisches 2-Photonen System in das bestehende Mikroskopsystem integriert. Ein Faserbündel mit einem miniaturisierten Objektiv wurde für die bewegliche Lichtführung verwendet. Die auftretende Dispersion in einem solchen Faserbündel hat eine verlängernde Auswirkung auf ultrakurze Laserpulse. Um die 2-Photonenabsorption auch mit dieser Methode zu ermöglichen, wurde ein zusätzlicher Pulskompressor aus optischen Reflexionsgittern aufgebaut. Es konnten erste 2-Photonenbilder erzeugt werden.

Für die Untersuchung von Proteindynamiken wurde eine Methode entwickelt, um die Transportprozesse von Proteinen in Pflanzenzellen untersuchen zu können. Der an Proteine gekoppelte photoaktivierbare Farbstoff pa-GFP wurde in selektiven ROI's aktiviert und die Ausbreitungsdynamik durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Auf diese Weise konnten Transportvorgänge zwischen dem Zellkern und dem Zytosol der Zelle von HMGB2/3 Proteinen nachgewiesen werden.

9 Literaturverzeichnis

- [Add, 2002] P. Addison: *The illustrated wavelet transform handbook*.
Institute of physics publishing, (2002).
- [And, 2006] V. Andresen, H. Spiecker, J. Martini, K. Tönsing, D. Anselmetti, R. Schade, S. Grohmann, G. Hildebrand, K. Liefelth: *Regenerative surgery (Metabolism and morphology of biological tissue - MeMo)*.
Biophotonics - Visions for better healthcare, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 361-404, ISBN 3-527-40622-0, (2006).
- [Arl, 2004] J. Arlt, W. Ertmer: *Quantenoptik*.
Vorlesungsmitschrift, (2004).
- [Ärzte, 2008] : *Ärzte Zeitung*.
http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/skelett_und_weichteilkrankheiten/arthrose/article/513958/arthrose-gesellschaftsproblem.html?sh=126&h=-222815726, (2008).
- [Bäni, 2002] W. Bäni: *Wavelets - Eine Einführung für Ingenieure*.
Oldenbourg Wissenschaftsverlag, (2002).
- [Bao, 2008] H. Bao, J. Allen, R. Pattie, R. Vance, M. Gu: *Fast handheld two-photon fluorescence microscope with a 475 μm x 475 μm field of view for in vivo imaging*.
OPTICS LETTERS, Vol. 33, No. 12, (2008).
- [Bar, 2002] A. Bartelt: *Steuerung der Wellenpaketdynamik in kleinen Alkaliclustern mit*

optimierten Femtosekundenpulsen.

Dissertation, Freie Universität Berlin. Fachbereich Physik, (2002).

[Bec, 2008a] W. Becker: *The bh TCSPC Handbook.*

3rd ed. Becker & Hickl GmbH, Berlin, (2008).

[Bec, 2008b] W. Becker: *Recording the Instrument Response Fuction of a Multiphoton FLIM System.*

Application Note, Becker & Hickl GmbH, (2008).

[Bec, 2005] W. Becker: *Advanced time-correlated single-photon counting techniques.*

Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (2005).

[Ber, 2010] MY Berezin, S. Achilefu: *Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging.*

Chem. Rev. 2010, 110, 2641–2684, (2010).

[Bergh, 2007] J. Bergh, F. Ekstedt, M. Lindberg: *Wavelets mit Anwedungen in Signal- und Bildverarbeitung.*

Springer Berlin Heidelberg, (2007).

[Berg, 2007] T. Bergmann, M. Tiemann, J. Matini, K. Tönsing, D. Anselmetti: *Multi-focal multispectral descanned detection in TPLSM.*

Proceedings of SPIE, Vol. 6630, 663015, (2007).

[Bet, 2006] E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H.F. Hess: *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution.*

Science, Vol. 313, no. 5793, 1642-1645, (2006).

[Bis, 2000] C.M. Bishop: *Neural networks for pattern recognition.*

Oxford University Press, (2000).

- [Bös, 2003] L. Bös, A. Ellermann: *Arthroskopische Diagnostik und Klassifikation von Knorpelschäden*.
Arthroskopische Diagnostik, (2003).
- [Böt, 2007] K. Bötsch: *Funktionelle Anatomie des Gelenkknorpels*.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Tierärztlichen Fakultät, (2007).
- [Bro, 2008] K.G.M. Brockbank, W.R. MacLellan, J. Xie, S.A. Hamm-Alvarez, Z.Z. Chen, K. Schenke-Layland: *Quantitative second harmonic generation imaging of cartilage damage*.
Cell Tissue Banking, 9:299-307, (2008).
- [Bru, 2000] J. Bruns, J. Steinhagen: *Der Knorpelschaden als präarthrotische Defomität - biologische Grundlagen*.
Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrg. 51, Nr.1, (2000).
- [Buc, 1994] J.A. Buckwalter, S. Lohmander: *Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development*.
J Bone Joint Surg Am. ;76:1405-1418, (1994).
- [Cal, 2004] E. Calvo, I. Palacios, E. Delgado, O. Sanchez-Pernaute, R. Largo, J. Egido, G. Herrero-Beaumont: *Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis*.
OsteoArthritis and Cartilage 12, 878e886, (2004).
- [Car, 2005] K. Carlson, et.al.: *In vivo fiber-optic confocal reflectance microscope with an injection-molded miniature objective lens*.
Applied optics 44, 1792-1796, (2005).
- [Cha, 1993] T.Chang, C.-C. Kuo: *Texture analysis and classification with treestructured wavelet transform*.
IEEE Transactions on Image Processing, 2(4):429-441, (1993).

- [Cle, 2010] M. Clemens: *Wavelet - Tutorial*.
<http://nt.eit.uni-kl.de/wavelet/index.html>, (Abrufdatum: 18.03.2010).
- [Con, 1984] D.V. O'Connor, D. Phillips: *Time-correlated single photon counting*.
Academic Press, London, (1984).
- [Conr, 1999] U. Conrad: *Statische und dynamische Untersuchungen ultradünner Metallfilme mit optischer Frequenzverdopplung und nichtlineare Mikroskopie*.
Dissertation, Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin, (1984).
- [Dem, 2005] W. Demtröder: *Experimentalphysik 3; Atome, Moleküle und Festkörper*.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2005).
Dritte, überarbeitete Auflage
- [Dem, 2007] W. Demtröder: *Laserspektroskopie*.
Springer, Berlin; , (2007).
Auflage: 5., erweiterte und neubearbeitete Auflage
- [Denk, 1990] W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb: *2-photon laser scanning fluorescence microscopy*.
Science, 248:73-76, (1990).
- [Denk, 1997] W. Denk, K. Svoboda: *Photon upmanship: Why multiphoton imaging is more than a gimmick*.
Neuron, Vol. 18, 351-357, (1997).
- [DAH, 2011] Deutsche Arthrose-Hilfe e.V. - Hilfe für gelenkranke Menschen: *Was ist Arthrose?*.
<http://www.arthrose.de/arthrose/was-ist-arthrose.html>, (Abrufdatum: 28.03.2011).
- [Dic, 1996] D.L. Dickensheets, D.S. Kino: *Micromachined scanning confocal optical microscope*.
Optical letters 21, 764-766, (1996).

- [Due, 2002] R. Düsing: *Multidimensionale Fluoreszenzspektroskopie in der Umweltanalytik*.
Herbert UtZ Verlag GmbH, (2002).
- [Eic, 2006] J. Esser, H.J. Eichler: *Laser - Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*.
6. Auflage Springer Berlin Heidelberg New York, (2006).
- [Ess, 2001] C. Esser: *Wavelet Transformation von Standbildern*.
Studienarbeit vorgelegt am Lehrstuhl für Praktische Informatik IV, (2001).
- [Flu, 2005a] B.A. Flusberg, E.D. Cocker, W. Piyawattanametha, J.C. Jung, E.L.M. Cheung, M.J. Schnitzer: *Fiber-optic fluorescence imaging*.
Nature methods, Vol.2, No. 12, (2005).
- [Flu, 2005b] B.A. Flusberg, J.C. Jung, E.D. Cocker, E.D. Anderson, M.J. Schnitzer:
In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microscope.
Optical letters 30, 2272-2274, (2005).
- [Fork, 1987] R.L. Fork, C.H. Brito Cruz, P.C. Becker, C.V. Shank: *Compression of optical pulses to six femtoseconds by using cubic phase compensation*.
Optics letters, (1987).
- [Fri, 2003] J. Fritz, W.A. Aicher, H.J. Eichhorn: *Praxisleitfaden der Knorpelreparatur*.
Springer Verlag, (2003).
- [Fu, 2006] L. Fu, A. Jainb, H. Xieb, C. Cranfield, M. Gu: *Nonlinear optical endoscopy based on a doubleclad photonic crystal fiber and a MEMS mirror*.
OPTICS EXPRESS, Vol. 14, No. 3, (2006).
- [Göp, 1931] M. Göppert-Mayer: *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*.
Ann. Phys., 9:273-294, (1931).

- [Gly] E.F. Glynn: *efg's computer lab, image processing, tech notes*.
<http://www.efg2.com/Lab/ImageProcessing/TestTargets/index.html>
USAF1951, (Abrufdatum: 20.04.2010).
- [Göb, 2004] W. Gobel, J.N. Kerr, A. Nimmerjahn, F. Helmchen: *Miniaturized two-photon microscope based on a flexible coherent fiber bundle and a gradient-index lens objective*.
Opt. Lett. 29, 2521–2523, (2004).
- [Grin, 2010] Grintech GmbH: *Einführung: Gradient Index (GRIN) lenses*.
Homepage Firma Grintech GmbH, Abrufdatum 20.10.2010, (2010).
- [Gün, 2003] T. Günther: *Femtosekunden Nahfeldspektroskopie an einzelnen Halbleiterquantenpunkten*.
Dissertation, Humboldt Universität Berlin, (2003).
- [Gus, 2008] M.G. Gustafsson, L. Shao, P.M. Carlton, C.J. Wang, I.N. Golubovskaya, W. Zacheus Cande, D.A. Agard, J.W. Sedat: *Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination*.
Biophysical Journal, Volume 94, Issue 12, 4957-4970, (2008).
- [Heg, 2006] A.A. Hegewald: *Chondrogenes Differenzierungspotential me-senchymaler Stammzellen in hochdichten 3D-Kulturen und im bioresorbierbaren Polymer-Vlies*.
Dissertation, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Fakultät, (2002).
- [Hei, 2002] A. Heisterkamp: *Einsatz ultrakurzer Laserpulse in der refraktiven Laserchirurgie*.
Dissertation, Universität Hannover, Fachbereich Physik, (2002).
- [Hell, 1994] S.W. Hell, J. Wichmann: *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*.

Optics letters, Vol. 19, Issue 11, 780-782, (1994).

- [Hell, 2005] S.W. Hell: *Hochauflösende 3D-Lichtmikroskopie*.
Medizinische Physik 3, 179-214, (2005).
- [Hel, 2001] F. Helmchen, M.S. Fee, D.W. Tank, W. Denk: *A miniatur head-mounted two-photon microscope. High-resolution brain imaging in freely moving animals*.
Neuron 31, 903-912, (2001).
- [Hel, 2005] F. Helmchen: *Dynamic Confocal Imaging of Living Brain Miniaturization of fluorescence microscopes using fibre optics*.
Experimental Physiology, 87.6, (2002).
- [Hel, 2005] F. Helmchen, W. Denk: *Deep tissue two-photon microscopy*.
Nature methods, Vol. 2 No. 12, (2005).
- [Hem, 2007] H. Hempfling, K. Bohndorf: *Begutachtung des Knorpelschadens*.
Trauma und Berufskrankheit, 9:284-295, Springer Medizin Verlag, (2007).
- [Hes, 2006] S.T. Hess, T.P. Girirajan, M. D. Mason: *Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*.
Biophysical Journal. 91, Nr. 11, 2006, S. 4258–4272, (2006).
- [Hof, 1999] U. Hofmann, S. Muehlmannm M. Witt, K. Dorschel, R. Schutz, B. Wagner: *Electrostatically driven micromirrors for a miniaturized confocal laser scanning microscope*.
Proceedings of SPIE 3878, 29-38, (1999).
- [Hof, 2010] G.O. Hofmann, J. Marticke, R. Grossstück, M. Hoffmann, M. Lange, H.W. Plettenberg, R. Braunschweig, O. Schilling, I. Kaden, G. Spahn: *Detection and evaluation of initial pathology in man: A comparison between MRT, arthroscopy and near-infrared spectroscopy (NIR) in their initial knee pain*.

- Pathophysiology 17, 1-8, (2010).
- [Iga, 1980] K. Iga: *Theory for gradient-index imaging*.
Applied Optics, Vol. 19, No. 7, (1980).
- [Jer, 1997] J. Jerosch, W.H.M. Castro, M.C. de Waal Malefijt, M. Busch, A. van Kampen: *Interobservervarianz bei der diagnostischen Arthroskopie des Kniegelenks*.
Der Unfallchirurg, 100:782-786, Springer Medizin Verlag, (1997).
- [Jun, 2004] J.C. Jung, A.D. Mehta, E. Aksay, R. Stepnoski, M.J. Schnitzer: *In Vivo Mammalian Brain Imaging Using One- and Two-Photon Fluorescence Microendoscopy*.
J Neurophysiol 92: 3121–3133, (2004).
- [Kel, 1957] J.H. Kellgren, J.S. Lawrence: *Radiological assessment of osteo-arthritis*.
Ann Rheum Dis 16: 494–502, (1957).
- [Kla, 1999] B. Kladny, P. Martus, K.H. Schiwy-Bochat, G. Weseloh, B. Swoboda: *Measurement of cartilage thickness in the human knee-joint by magnetic resonance imaging using a three-dimensional gradient-echo sequence*.
International Orthopaedics (SICOT) 23:264–267, (1999).
- [Kai, 1960] W. Kaiser, C.G.B. Garret: *Two-photon excitation in $CaF_2 : Eu^{2+}$* .
Physical review letters 7(6):229–231, (1960).
- [Kni, 2001] J. Knittel, L. Schnieder, G. Buess, B. Messerschmidt, T. Possner: *Endoscope-compatible confocal microscope using a gradient index-lens system*.
Optics communications, 188, 267-273, (2001).
- [Köh, 2007] K. König, A. Ehlers, I. Riemann, S.Schenkl, R. Bückle, M- Kaatz: *Clinical two-photon microendoscopy*.
Microsc. Res. and Tech. 70, 398-402, (2007).

- [Koh, 1982] T. Kohonen: *Self-organized formation of topologically correct feature maps*. Biological Cybernetics, 43:59–69, (1982).
- [Koh, 2001] T. Kohonen: *Self-organizing Maps*. Springer Series in Information Sciences. 3rd edition, (2001).
- [Kok, 2010] S. Koke, C. Grebing, H. Frei, A. Anderson, A. Assion, G. Steinmeyer: *Direct frequency comb synthesis with arbitrary offset and shot-noise-limited phase noise*. Nature photonics, Vol. 4, 462-465, (2010).
- [Kra, 1992] F. Krausz, M.E. Fermann, T. Brabec, P.F. Curley, M. Hofer, M.H. Ober, C. Spielmann, E. Wintner A.J. Schmidt: *Femtosecond Solid-State Lasers*. IEEE Journal of quantum electronics, vol. 28, no. 10, (1992).
- [Les, 2007] B. Lessmann: *Exploration of wavelet-based feature spaces in medical image analysis*. Dissertation, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, (2007).
- [Les, 2007b] B. Lessmann, T.W. Nattkemper, V.H. Hans, A. Degenhard: *A method for linking computed image features to histological semantics in neuropathology*. Journal of biomedical informatics, 40, 631-641, (2007).
- [Lia, 2002] C. Liang, K.B. Sung, R. Richards-Kortum, M.R. Descour: *Design of a highnumerical aperture miniature microscope objective for an endoscopic fiber confocal reflectance microscope*. Appl. Opt. 41, 4603–4610, (2002).
- [Liv, 1996] S. Livens, P. Scheunders, G. van de Wouwer, D. van Dyck, H. Smets, J. Winkelmans, W. Bogaerts: *A texture analysis approach to corrosion image classification*. Microscopy, Microanalysis, Microstructures, 7(2):1–10, (1996).

- [Lou, 2000] R. Loudon: *The quantum theory of light*.
Oxford science publications, Third edition, (2000).
- [Luc, 2009] R. Luchowski, P. Kapusta, M. Szabelski, P. Sarkar, J. Borejdo, Z. Gryczynski, I. Gryczynski: *Förster resonance energy transfer (FRET)-based picosecond lifetime reference for instrument response evaluation*.
Meas. Sci. Technol. 20 (2009) 095601 (7pp), (2009).
- [Man, 1982] H.J. Mankin: *Current Concepts Review - The Response of Articular Cartilage to Mechanical Injury*.
J Bone Joint Surg Am. 1982;64:460-466, (1982).
- [Man, 2009] J. Mansfield, J. Yu, D. Attenburrow, J. Moger, U. Tiralpur, J. Urban, Z. Cui, P. Winlove: *The elastin network: its relationship with collagen and cells in articular cartilage as visualized by multiphoton microscopy*.
J. Anat., 215, pp682-691, (2009).
- [Mar, 2000a] S. Marlovits, V. Vesei: *Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten - Teil 1: Grundlagen der Knorpelbiologie und der Heilung von Knorpeldefekten*.
Acta Chir. Austriaca, Vol. 32, No. 3, (2000).
- [Mar, 2010] S. Marlovits, S. Aldrian, C. Albrecht, B. Wondrasch: *Diagnostik und Therapie von Knorpelverletzungen*.
39. ÖGU-Fortbildungsseminar: Knie, 15. - 16.01.2010, AUVA Wien, (2010).
- [Mart, 2003] V. Martinek: *Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels*.
Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 54, Nr. 6, (2003).
- [Mart, 2009] V. Martinek, A.B. Imhoff: *Arthrose*.
Arthroskopie, 22:175–175, Springer Medizin Verlag, (2009).
- [Marti, 2006] J. Martini: *New detection dethods in multifocal multiphoton microscopy*.

Dissertation, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, (2006).

[Marti, 2006b] J. Martini, K. Tönsing, M. Dickob, R. Schade, K. Liefeth, D. Anselmetti: *2-Photon laser scanning microscopy on native human cartilage and collagen-membranes for tissue engineering*.
Proceedings of SPIE, Vol. 6089, 60891N, p. 274-282, (2006).

[Marti, 2007] J. Martini, V. Andresen, D. Anselmetti: *Scattering suppression and confocal detection in multifocal, multiphoton microscopy*.
J. Biomedical optics, 12, 034010, (2007).

[Marti, 2007b] J. Martini, K. Schmied, R. Palmisano, K. Toensing, D. Anselmetti, T. Merkle: *Multifocal two-photon laser scanning microscopy combined with photo-activatable GFP for in vivo monitoring of intracellular protein dynamics in real time*.
Journal of Structural Biology 158, 401–409, (2007).

[Mat, 2009] S.J. Matcher: *A review of some recent developments in polarization-sensitive optical imaging techniques for the study of articular cartilage*.
Journal of applied physics 105, 102041, (2009).

[McGo, 2000] LB McGown, K. Nithipatikom: *Molecular fluorescence and phosphorescence*.
Applied Spectroscopy Reviews, 35: 4, 353 — 393, (2000).

[Mes, 2008] D. Meschede: *Optik, Licht und Laser*.
3. Auflage, Vieweg+Teubner Verlag, (2008).

[Mes, 2003] B. Messerschmidt: *Gradientenoptik - eine innovative Mikrooptik für die Optoelektronik und die medizinische Bilderfassung*.
Photonik 6/2003, (2003).

[Mes, 2005] B. Messerschmidt: *Gradientenoptik: Innovative Mikrooptiken für Laserdi-
odenstrahlformung und Sensorik*.

- Laser Journal, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (2005).
- [Mie, 2008] E. Miesak, R. Negres: *Alignment Procedure for a Dual Grating Pulse Compressor*.
Applied Optics, Vol. 37, Issue 34, pp. 8146-8147, (1998).
- [Mis, 2010] M. Misiti, Y. Misiti, G. Oppenheim, J.M. Poggi: *Wavelet toolbox 4, Getting started Guide, Matlab*.
Mathworks, online Version 4.6, (2010).
- [Mül, 2004] S. Müller, L. Ronfani, B.E. Bianchi: *Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokinin function*.
J Intern Med 255:332-343, (2004).
- [Nak, 1999] O. Nakamura: *Fundamental of two-photon microscopy*.
Microscopy research and technique, 47:165-171, (1999).
- [Nie, 2000] T. Nielsen, M. Fricke, D. Hellweg, P. Andresen: *High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy*.
Journal of Microscopy, Vol. 201, Pt 3, pp. 368-376, (2000).
- [Ont, 2008] J. Ontrup: *Semantic visualization with hyperbolic self-organizing maps: a novel approach for exploring structure in large data sets*.
Dissertation, Techn. Fakultät, Universität Bielefeld, (2008).
- [Pat, 2002] G.H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz: *A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells*.
Science Vol. 297, 1873-1877, (2002).
- [Paw, 2006] J.B. Pawley: *Handbook of biological confocal microscopy*.
Springer, 3. edition, (2006).
- [Ped, 2010] D.S: Pedersen, T. Merkle, B. Marktl, D.L. Lildballe, M. Antosch, T.

- Bergmann, K. Tönsing, D. Anselmetti, K.D: Grasser: *Nucleocytoplasmic distribution of the Arabidopsis chromatin-associated HMGB2/3 and HMGB4 proteins.*
Plant Physiology, (2010).
- [Por, 2000] T. Porwol, A.-R. Stromaier: *Fluorescence Lifetime Imaging als neues Kontrastverfahren in der Konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie.*
Biospektrum, (2000).
- [Post, 2005] J.N. Post, K.A. Lidke, B. Rieger, D.J. Arndt-Jovin: *One- and two-photon photoactivation of a paGFP-fusion protein in live Drosophila embryos.*
FEBS Letters 579, 325–330, (2005).
- [Piy, 2000] W. Piyawattanametha, H. Toshiyoshi, J. LaCosse, M.C. Wu: *Surface micromachined confocal scanning optical microscope.*
Technical digist series of CLEO, (2000).
- [Pul, 2001] O. Pullig, D. Pfander, B. Swoboda: *Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression.*
Orthopäde 2001 · 30:825-833, Springer-Verlag, (2001).
- [Ran, 1999] T. Randen, J. Husoy: *Filtering for texture classification: a comparative study..*
IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 21(4):291–310, (1999).
- [Res, 2004] C. Resinger, V. Vecsel, S. Marlovits: *Therapieoptionen zur Behandlung von Knorpelschäden, Techniken und Indikationen.*
Radiologie 2004 - 44:756-762, Springer Verlag, (2004).
- [Roe, 2000] W. Roedel: *Physik unserer Umwelt.*
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-67180-3, (2000).

- [Rou, 2000] A.R. Rouse, A. Kano, J.A. Udovich, S.M. Kroto, A.F. Gmitro: *Design and demonstration of a miniature catheter for a confocal microendoscope*. Appl. Opt. 43, 5763–5771, (2000).
- [Rud, 1998] M. Rudert, C.J. Wirth: *Knorpelregeneration und Knorpelersatz*. Orthopäde, 27:309-321, Springer-Verlag, (1998).
- [Rus, 2004] P. St. John Russell, T.A. Birks, J.C. Knight: *Photonic crystal fibers*. Patent application publication, Pub.No. US2004/0105641 A1, (2004).
- [Saa, 2005] Andre Saal, J. Gaertner, M. Kuehling, Bernd Swoboda, Stefan Klug: *Macroscopic and radiological grading of osteoarthritis correlates inadequately with cartilage height and histologically demonstrable damage to cartilage structure*. Rheumatol Int 25: 161–168, (2005).
- [Saa, 2009] S. Saarakkala, Shu-Zhe Wang, Yan-Ping Huang, Yong-Ping Zheng: *Quantification of the optical surface reflection and surface roughness of cartilage using optical coherence tomography*. Physics in medicine and biology, (2009).
- [Sau, 2007] F. Sauer: *Wellenpaketdynamik in Alkali-Dimeren: Untersuchung und Steuerung durch kohärente Anregung mit fs-Pulsen*. Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Physik, (2007).
- [Sch, 2005] M. Schneider, S. Barozzi, I. Testa, M. Faretta, A. Diaspro: *Two-Photon Activation and Excitation Properties of PA-GFP in the 720–920nm Region*. Biophysical journal, Vol. 89, 1346-1352, (2005).
- [Sei, 2002] E.J. Seibel, Q.Y. Smithwick: *Unique features of optical scanning , single fiber endoscopy*. Lasers Surg. Med. 30, 177-183, (2002).

- [Sil, 1984] S. de Silvestre, Paolo Laporta, Orazio Svelto: *The role of cavity dispersion in cw mode-locked lasers*.
IEEE Journal of quantum electronics, (1984).
- [Spa, 2007] G. Spahn, R. Wittig, E. Kahl, H.M. Klinger, T. Mückley, G.O. Hofmann: *Diagnostik von Knorpelschäden des Kniegelenks*.
Der Unfallchirurg, 110:414-424, Springer Medizin Verlag, (2007).
- [Sto, 2009] M. Stolz, et.al.: *Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy*.
Nature nanotechnology, (2009).
- [Tre, 2005] M. Tremont: *Erzeugung und Charakterisierung optischer Impulse im Piko-sekundenbereich auf der Basis aktiv modengekoppelter DBR-Diodenlaser zur effizienten nichtlinearen Frequenzkonversion*.
Cuviliar Verlag, Göttingen, (2005).
- [Ult, 2003] A. Ultsch: *U*-Matrix: a Tool to visualize Clusters in high dimensional Data..*
Technical report, Nr. 36, (2003).
- [Var, 2006] C. Varini: *Visual exploration of multivariate data in breast cancer by dimensional reduction*.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld, (2006).
- [Ves, 1999] J. Vesanto, J. Himberg, E. Alhoniemi, J. Parhankangas: *Self-organizing map in MATLAB: the SOM Toolbox*.
Proceedings of the Matlab DSP Conference, Espoo, Finland, pp. 35-40, (1999).
- [Wad, 2002] W.J. Wadsworth, A. Ortigosa-Blanch, J.C. Knight, T.A. Birks, T.-P. Martin Man, P. St. J. Russell: *Supercontinuum generation in photonic crystal fibers and optical fiber tapers: a novel light source*.

JOSA B, Vol. 19, Issue 9, pp. 2148-2155, (2002).

[Wes, 2009] R. Wesselmann: *Topographische Aanalyse einzelner Kernporenkomplexe mit hochauflösender $4\text{-}\pi$ Lichtmikroskopie.*

Dissertation, Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Fachbereich Biologie, (2009).

[Wou, 1993] G.van de Wouwer, P. Scheunders, D. van Dyck: *Statistical texture characterization from discrete wavelet representation.*

IEEE Transactions on Image Processing, 8(4):592–598, (1993).

[Xu, 1996] C. Xu, R.M. Williams, W. Zipfel, W.W. Webb: *Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorephores.*

Bioimaging 4, 198-207, (1996).

[Yang, 2010] H. Yang, K.J. Tracey: *Targeting HMGB1 in inflammation.*

Biochim Biophys Acta 1799:149-156, (2010).

[Yeh, 2005] A.T. Yeh, M.J. Hammer-Wilson, D.C. van Sickle, H.P. Benton, A. Zoumi, B.J. Tromberg, G.M. Peavy: *Nonlinear optical microscopy of articular cartilage.*

OsteoArthritis and Cartilage 13, 345-352, (2010).

[Zac, 2007] J. Zacher, H. D. Carl, B. Swoboda, M. Backhaus: *Bildgebung bei der Arthrose peripherer Gelenke.*

Zeitschrift für Rheumatologie 3, 66:257–266, (2007).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Ausführung dieser Arbeit unterstützt oder begleitet haben.

Als erstes möchte ich natürlich Prof. Anselmetti dafür danken, mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen zu haben und die Betreuung meiner Arbeit übernommen zu haben. Das entgegengebrachte Vertrauen und die wissenschaftlichen Freiheiten sind sicherlich nicht selbstverständlich. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Huser für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Dickob bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, humanes Knorpelgewebe untersuchen zu können sowie für das große Engagement und Interesse für meine durchgeführten Experimente.

Eine ganz tolle Unterstützung habe ich von Prof. Nattkemper erfahren. Hier wurde aus einer einfachen Anfrage zur Bildauswertung eine tolle Zusammenarbeit mit vielen neuen Erkenntnissen meinerseits. Bei ihm möchte ich mich für die Zeit und Mühe bedanken, die nötig war um mir einige Konzepte der Bildauswertung näher zu bringen.

Einen besonderen Dank verdienen auch Dr. Merkle und seine Mitarbeiter, die mit stets transfizierte Protoplasten zur Verfügung stellen konnten. Die Zusammenarbeit war stets sehr angenehm.

Ein großes Dankeschön möchte ich an die gesamte Arbeitsgruppe der Biophysik richten. Das Arbeiten in dieser Gruppe hat stets viel Freude bereitet. Im Besonderen möchte ich mich bei Dr. Katja Tönsing und Christoph Pelargus für die vielfältige Unterstützung bedanken sowie bei Gabi Krome für das Erledigen des Organisatorischen (und natürlich die Kaffeeverwaltung). Meine Bürokollegen möchte ich an dieser Stelle ebenfalls gesondert erwähnen. Sie haben dazu beigetragen, dass mir die Arbeit immer sehr viel Freude bereitet hat. Dank an Sebastian Horstmeier und Sebastian Zünkeler dafür (eine abschließende worms-Statistik würde mich auch interessieren). An dieser Stelle darf auch mein Vorgänger Dr. Jörg Martini nicht unerwähnt bleiben, der mir den Mikroskopaufbau übergeben

hat und mich auch aus der Ferne noch sehr gut unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich der E- und M-Werkstatt für die gute Zusammenarbeit danken.

Ein Dank gebührt auch meinen derzeitigen Arbeitskollegen und Professoren in Gießen, die mich stets bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und mir nötige Freiräume gegeben haben.

Ein ganz persönlicher Dank geht natürlich noch an mein privates Umfeld mit meiner Familie. Meine Frau Elena und neuerdings auch unser Sohn Timmo konnten mir immer genau die Motivation oder die Distanz zu meiner Arbeit geben, die ich brauchte. Mit der Sicherheit meiner Familie im Rücken sind mir die Abende des Schreibens um einiges einfacher gefallen.

Publikationen

Patentantrag

Anordnung und Verfahren zur Gewinnung diagnostisch relevanter Parameter von humanem Knorpelgewebe mittels Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie, *Anmeldung am 25.12.2009*, Deutsches Patent- und Markenamt

Publikationen und Konferenzbeiträge zur vorgelegten Arbeit

Multifocal multispectral descanned detection in TPLS

T. Bergmann, M. Tiemann, J. Martini, K. Tönsing, and D. Anselmetti

Proceedings of SPIE, Vol. 6630, 663015 (2007), Poster

2-Photon laser scanning microscopy of cartilage material

T. Bergmann, K. Tönsing and D. Anselmetti

DPG-Tagung, Berlin (2008), Poster

Nucleocytoplasmic distribution of the Arabidopsis

chromatinassociated HMGB2/3 proteins

D.S. Pedersen, T. Merkle, B. Marktle, D.L. Lildballe, T. Bergmann, K. Tönsing, D. Anselmetti, K.D. Grasser

Plant Physiology, December 2010, Vol. 154, pp. 1831–1841

Categorization of 2-photon microscopy images of human articular cartilage into states of arthritis

T. Bergmann, M. Fiebich, T.W. Nattkemper and D. Anselmetti

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinischen Technik (2011), Talk

weitere Publikationen und Konferenzbeiträge

Fluorescent nanodiamonds as highly stable biomarker for endotoxin verification

T. Bergmann, J.M. Burg, M. Lillholt, U. Maeder, S. Beer, D. Salzig, M. Ebrahimi, P. Czermak, M. Fiebich

SPIE BiOS, San Francisco (2012), accepted poster

Quantifying fluorescence signals in confocal image stacks deep in turbid media

S. Beer, U. Maeder, T. Bergmann, J.M. Burg, M. Fiebich, F. Runkel

SPIE BiOS, San Francisco (2012), accepted poster

Spectrally resolved visualization of fluorescent dyes permeating into skin

U. Maeder, T. Bergmann, S. Beer, J.M. Burg, T. Schmidts, F. Runkel, M. Fiebich

SPIE BiOS, San Francisco (2012), accepted poster

Development of a skin phantom of the epidermis and evaluation by using fluorescence techniques

T. Bergmann, S. Beer, U. Mäder, J.M. Burg, P. Schlupp, T. Schmidts, F. Runkel, M. Fiebich

Proc SPIE, Vol. 7906, 79060T (2011), DOI: 10.1117/12.874676

Time-resolved confocal microscopy of cryogenic processes in biological tissues

M. Schellenberg, T. Bergmann, E. Peev, M. Kloster, J. Napier, W. Neu

Proc. of SPIE Vol. 7904 79041F-1 (2011), DOI: 10.1117/12.874701

Studying skin penetration by NMR imaging

J.M. Burg, M. Voelker, P. Schlupp, T. Schmidts, U. Mäder, T. Bergmann, F. Runkel, J.T. Heverhagen, M. Fiebich

Proc. SPIE, Vol. 7892, 78920V (2011), DOI: 10.1117/12.874886

4D confocal microscopy method for drug localization in the skin

U. Maeder, T. Bergmann, J.M. Burg, S. Beer, T. Schmidts, J.T. Heverhagen, F. Runkel, M. Fiebich

Proc. ECBO, Vol. 8086 Advanced Microscopy Techniques II, 80861A (2011), DOI: 10.1117/12.889497

Calibration phantom for quantification of fluorescent labels in deep skin tissue

S. Beer, U. Maeder, T. Bergmann, P. Schlupp, T. Schmidts, J.T. Heverhagen, F. Runkel, M. Fiebich

Proc. ECBO, Vol. 8086 Advanced Microscopy Techniques II, 80861A (2011),

DOI: 10.1117/12.889973

Evaluating an automatic determination of a virus titer

J. Verbe, U. Maeder, T. Bergmann, T. Grein, D. Freimark, P. Czermak, M. Fiebich

Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für biomedizinische Technik (2010), poster

Determination of a virus titer by automated cell counting

J. Verbe, U. Maeder, T. Bergmann, D. Freimark, T. Grein, P. Czermak, M. Fiebich

Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für biomedizinische Technik (2010), poster