

Scanning Laser Optical Tomography SLOT (IQ18)

Laborpraktikum durchgeführt im Block 1
22.10.2018 – 09.11.2018



Daniel Scheiermann
3227680

Felix Springer
10002537

1. März 2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
2	Scanning Laser Optical Tomography	2
2.1	Radontransformation	2
2.2	Funktionsweise	3
2.3	Versuchsaufbau	5
3	Ergebnisse	8
3.1	Auflösungsvermögen	8
3.2	Aufnahmen von Heuschreckengehirnen	12
3.2.1	Korrektur der Schiefelage	13
3.2.2	Darstellung der Rekonstruktion	13
3.2.3	Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung	16
3.2.4	Analyse	17
4	Diskussion	17
5	Fazit	17
6	Ausblick	18

1 Einleitung

In diesem Versuch wird die Methode der Tomographie am Beispiel der SLOT „Scanning Laser Optical Tomography“ untersucht. Dieses ist ein spezielles dreidimensionales Tomographie-Verfahren, das mit Lasern verschiedener Wellenlängen Streuung, Absorption und Fluoreszenz als Kontrastmechanismen nutzt.

Das dreidimensionale Präparat wird ebenenweise durch zweidimensionale Schnitte (Tomogramme) rekonstruiert und zu einem dreidimensionalen Bildobjekt zusammengesetzt. Das entstandene Bildobjekt ist nun vom Präparat getrennt und virtuell verfügbar. Daraus ergibt sich der Vorteil das Präparat unbeschädigt lassen zu können und dennoch die innere Struktur des Präparates zu untersuchen [1].

2 Scanning Laser Optical Tomography

2.1 Radontransformation

Bei allen auf Computertomographie basierenden Verfahren ist die Radontransformation die mathematische Grundlage zur Nutzung des integrierten Signals für eine 3D-Darstellung. Beim Durchleuchten des Präparats führt jegliche Wechselwirkung mit dem Präparat zu einer veränderten Intensität des eingestrahnten Lichtes. Nimmt man hinter dem Präparat dieses Signal für einen festen Einstrahlungswinkel ϕ auf, so erhält man eine über die Lauflinie des Strahls integrierte Signalabschwächung. Diese bildet einen Funktionswert der Radontransformierten $R(\rho, \phi)$ zu einem festen ϕ . Durch Abrastern entlang des Präparats, also Variation von ρ , erhält man die gesamte Radontransformierte, die in direktem Verhältnis zum Tomogramm der gescannten Ebene des Präparats steht. Scannt man das Präparat zusätzlich in z -Richtung, so erhält man Tomogramme, die zusammengenommen zu einem Tomographen und damit zu einem 3D-Objekt zusammengeführt werden können, das auch Informationen über das Innere des Präparats preisgibt.

Die Strahlen werden hierfür in Polarkoordinaten durch eine Schar von Geraden parametrisiert. Durch den Polarwinkel ϕ ist die Richtung der Strahlen und durch s wird der „Radius“ festgelegt. Weiterhin wird durch ρ der senkrechte Abstand von der Geraden, die im Winkel ϕ durch den Ursprung geht, festgelegt, wodurch die Schar der Strahlen parametrisiert wird.

$$\text{lin}_{\rho, \phi}(s) = \begin{pmatrix} \cos(\phi) & -\sin(\phi) \\ \sin(\phi) & \cos(\phi) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \rho \\ s \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \rho \cdot \cos(\phi) - s \cdot \sin(\phi) \\ \rho \cdot \sin(\phi) + s \cdot \cos(\phi) \end{pmatrix} \quad (1)$$

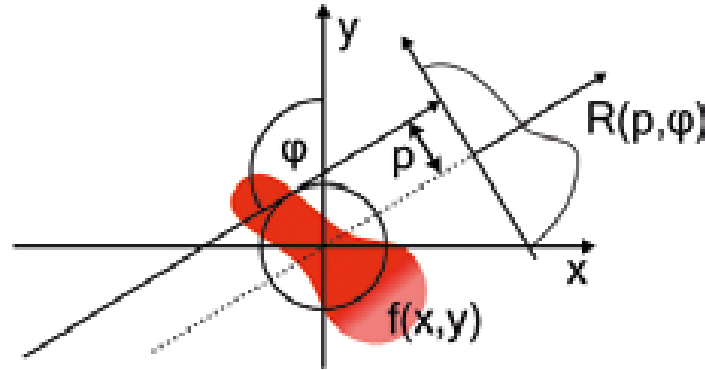


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Radontransformation: Parametrisierung eines Strahls $lin_{\rho,\phi}(s)$ in Polarkoordinaten, wobei s dem Radius und ϕ der Polarwinkel ist. Die Schar an Strahlen wird durch ρ parametrisiert. Das Präparat wird durch die rote Fläche $f(x, y)$ dargestellt und hinter dem Präparat ist das integrierte Signal über die verschiedenen Strahlen der Schar dargestellt, die zusammengenommen die Radontransformierte $R(\rho, \phi)$ ergeben [2].

Für eine zweidimensionale Funktion $f(x, y)$ ist die Radontransformierte das integrierte Signal über den parametrisierten Weg durch das Präparat:

$$R(\rho, \phi) = \int_{-\infty}^{\infty} f(lin_{\rho,\phi}(s)) ds = \int_{-\infty}^{\infty} f \left(\begin{matrix} \rho \cdot \cos(\phi) - s \cdot \sin(\phi) \\ \rho \cdot \sin(\phi) + s \cdot \cos(\phi) \end{matrix} \right) ds \quad (2)$$

Entscheidend für die Nutzung der Tomographie ist die Invertierbarkeit der Radontransformierten $R(\rho, \phi)$, denn dies ermöglicht die Rekonstruktion der ursprünglichen Funktion $f(x, y)$, also die Rekonstruktion des Präparates [2].

2.2 Funktionsweise

Die Funktionsweise von SLOT wird anhand des Schemas in Abbildung 2 beschrieben. SLOT basiert auf einem x-y-Scanner-System mit zwei Silberspiegeln, das den auf die Mitte des Präparates fokussierten Laser ablenkt und somit die Probe abrastert. Das Präparat muss optisch transparent sein, um Streuung innerhalb des Präparates zu verringern und eine höhere Transmission zu erreichen. Hierzu werden Glycerin oder ähnliche Lösungsmittel genutzt, da diese einen ähnlichen Brechungsindex wie feste organische Bestandteile haben. Das transmittierte Laserlicht wird von einer Photodiode hinter der Probenkammer detektiert. Um eine Rekonstruktion durchführen zu können sind Aufnahmen des Präparates von verschiedenen Richtungen nötig. Diese verschiedenen Aufnahmen werden durch einen Motor ermöglicht, der die Kapillare und damit das Präparat dreht. Weiterhin regt das Laserlicht das Präparat zur Fluoreszenz an.



Abbildung 2: Schema eines scannenden laseroptischen Tomographen (SLOT) [2]. Der schematische Kollimator ist im Versuchsaufbau ein Bündel von Glasfasern, das an die Unterseite der Küvette angebracht ist und mit der Form eine ähnliche Fläche ausfüllt wie die Photomultiplier-Diode (PMT), so dass möglichst viel der Diode ausgeleuchtet werden kann. Der Nutzen des Kollimators ist das gesammelte Licht senkrecht auf die dielektrischen Farbfilter zu leiten, denn nur dann sind die angegebenen Werte des Herstellers bezüglich der Transmission bestimmter Wellenlängen verlässlich. Ansonsten treten Abweichung der Reflexion und Transmission in Abhängigkeit vom Einfallswinkel entsprechend den Fresnelschen Formeln auf.

Dieses Fluoreszenzlicht wird mittels plankonvexen Linsen mit dazwischen liegendem Fluoreszenz-Filter gesammelt und auf den sensitiven Photomultiplier (PMT) geleitet [1].

2.3 Versuchsaufbau

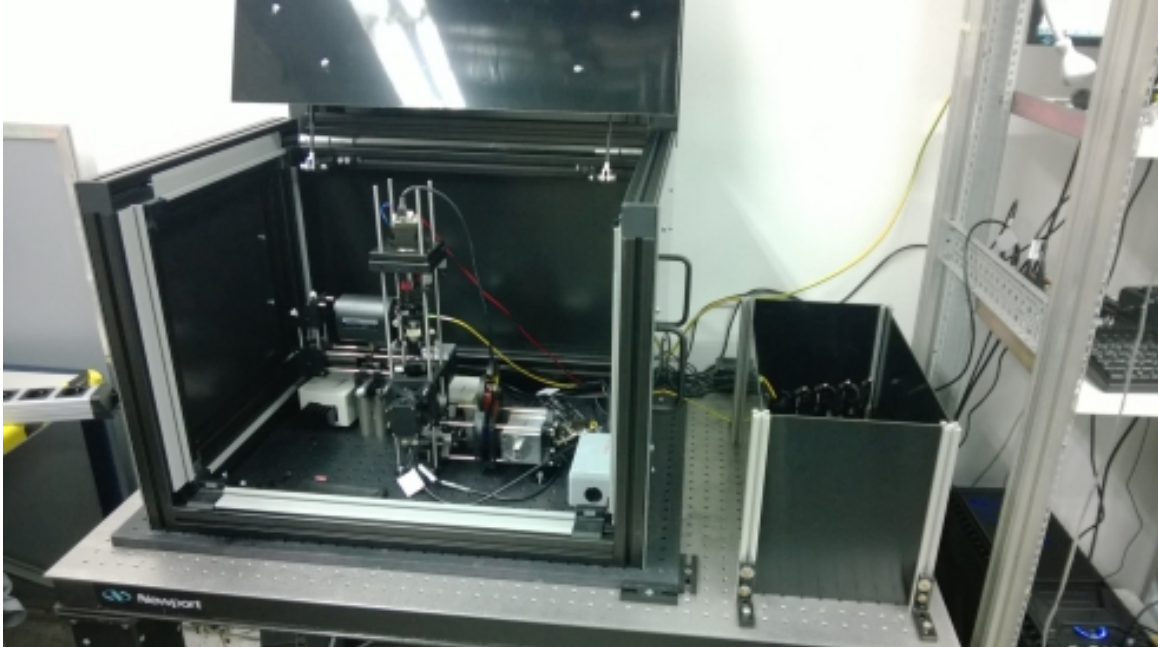
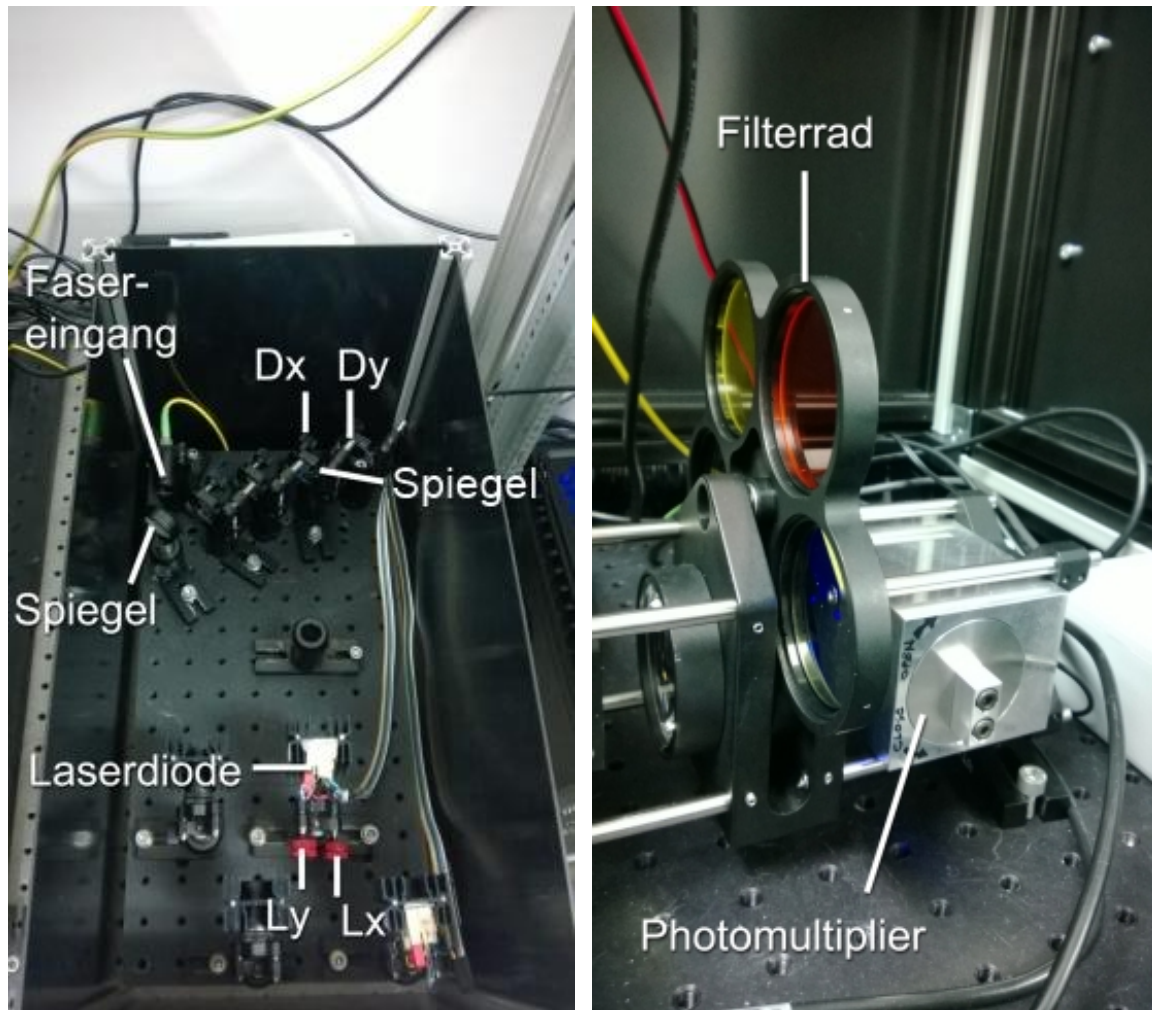


Abbildung 3: Versuchsaufbau: Der gesamte Versuchsaufbau befindet sich auf einer optischen Platte, um Störungen durch Vibration zu verringern. Weiterhin ist die Kompaktheit des Versuchsaufbaus zu sehen [1].



Abbildung 4: Das Teleskop ist für die Fokussierung und ermöglicht eine gewisse Flexibilität bei der Einstellung des Strahlendurchmessers des scannenden Lichtstrahls. Weiterhin sind x- und y-Scanner, die das Abrastern des Präparats ermöglichen, zusehen. [1]. Das Steinheil-Triplett ist eine aus drei Linsen zusammengesetzte Linse, die die nötigen Freiheitsgrade liefert um Seidel Aberration auszugleichen.



- (a) Die Ausrichtung der Laserdioden und der Spiegel in x- und y-Richtung ermöglicht mittels „Beam-Walk“ die Einkopplung des Lichts zweier Laserdioden mit den Wellenlängen $\lambda = 450 \text{ nm}$ und $\lambda = 520 \text{ nm}$.
- (b) Das Filterrad wird zur Selektion des Wellenbereichs genutzt, der detektiert werden soll und der Photomultiplier (PMT) wird genutzt, um das wenige Fluoreszenzlicht zu detektieren und für die Tomographie nutzbar zu machen.

Abbildung 5: Trennung der Laserkonfiguration vom restlichen Versuchsaufbau zur Verringerung der Wahrscheinlichkeit die Ergebnisse der Einkopplung des Diodenlichtes beim Experimentieren zu nichte zu machen. [1]. Weiterhin werden Dichromaten genutzt, um durch die selben Reflexionsobjekte verschiedene Wellenlängen einkoppeln zu können und das Experimentieren mit unterschiedlichen Wellenlängen durch An- und Ausschalten der entsprechenden Laserdioden problemlos gelingt.

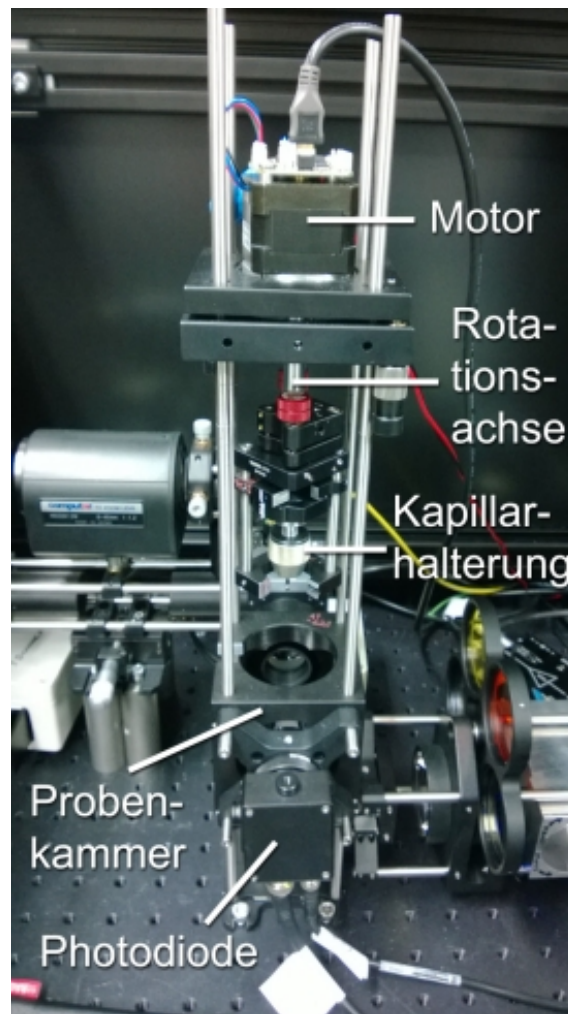


Abbildung 6: Zusehen ist der Turm mit der Rotationsachse, die beim Versuch dann mittels Kapillarhalterung das in einer Kapillare fixierte Präparat rotiert. In der Probenkammer wird dann eine Küvette mit Glycerin aus oben genannten Gründen stehen, in die die Kapillare eingetaucht ist. [1].

3 Ergebnisse

3.1 Auflösungsvermögen

Der Kontrast wurde für verschiedene Fokussierungen, Strahlendurchmesser und Wellenlängen des Lasers mithilfe eines USAF-Targets gemessen. Dadurch ergibt sich die Modulationsübertragungsfunktion.

Bei allen Messungen wurde die Dunkelaufnahme von der Abbildung des Targets abgezogen, um ein Rauschen herauszurechnen.

Für geringe Linienpaare pro Millimeter ($\frac{lp}{mm}$) wurde die Modulationsübertragungsfunktion in Abhängigkeit zu $\frac{lp}{mm}$ in horizontaler Scanrichtung in Abbildung 7 und zu $\frac{lp}{mm}$ in vertikaler Scanrichtung in Abbildung 8 dargestellt.

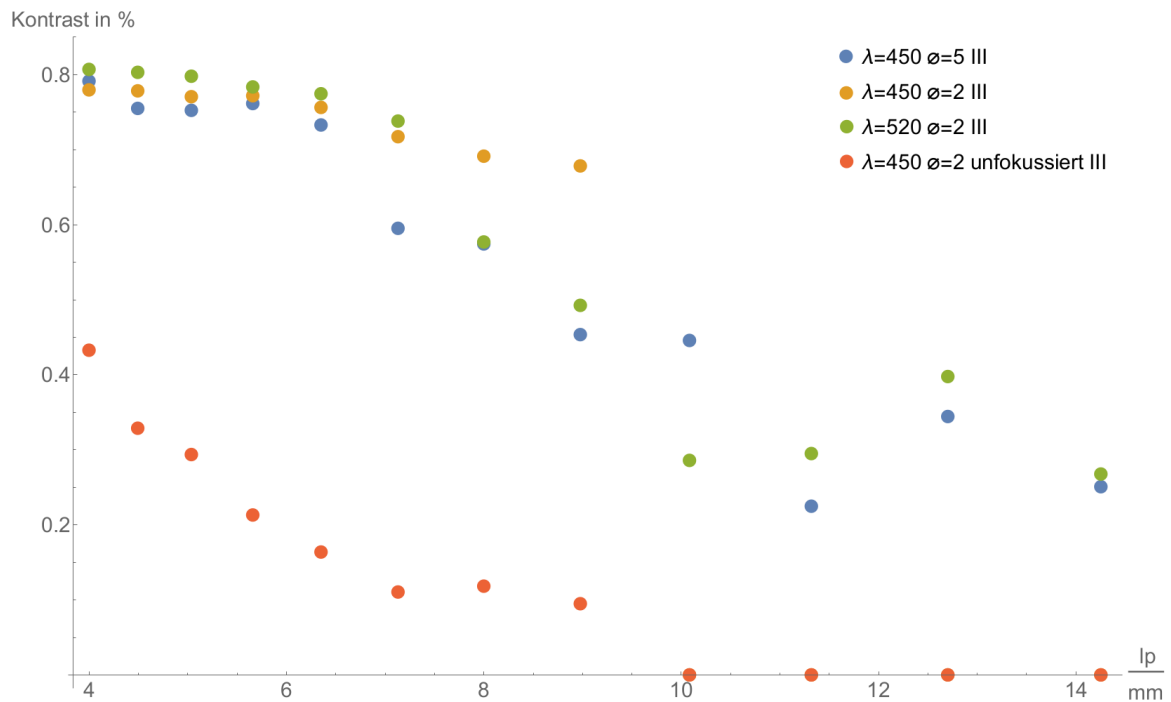


Abbildung 7: Kontrast bei geringen $\frac{lp}{mm}$ in horizontaler Scanrichtung, wobei in der Legende „III“ die Ausrichtung der Dunkellinien des USAF-Targets sind, woraus die Scanrichtung sich als horizontal erschließt.

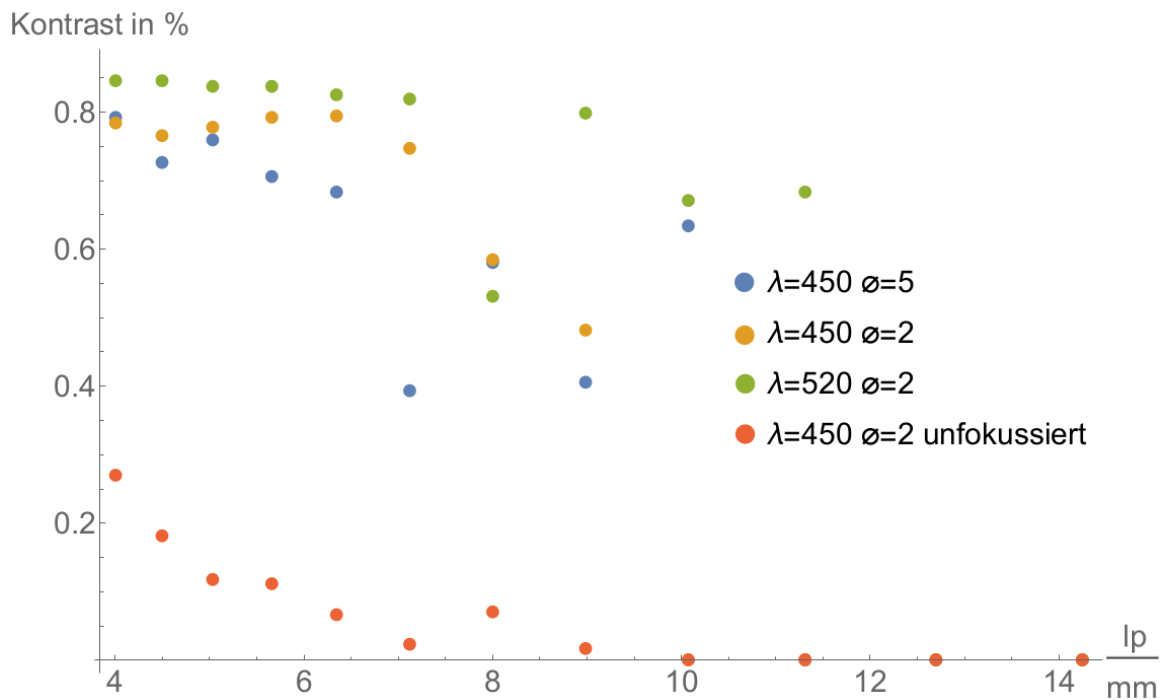


Abbildung 8: Kontrast bei geringen $\frac{lp}{mm}$ in vertikaler Scanrichtung.

Ein erhöhter Strahlendurchmesser verbessert den Kontrast.

Bei geringen $\frac{lp}{mm}$ ist der Kontrast für eine höhere Wellenlänge höher.

Der Kontrast ist in horizontaler und vertikaler Richtung von vergleichbarer Höhe.

Weiterhin sinkt der Kontrast rapide, falls ohne Fokussierung gemessen wird.

Für hohe $\frac{lp}{mm}$ ist der Kontrast für horizontale Scanrichtung in Abbildung 9 und für vertikale Scanrichtung in Abbildung 10 dargestellt.

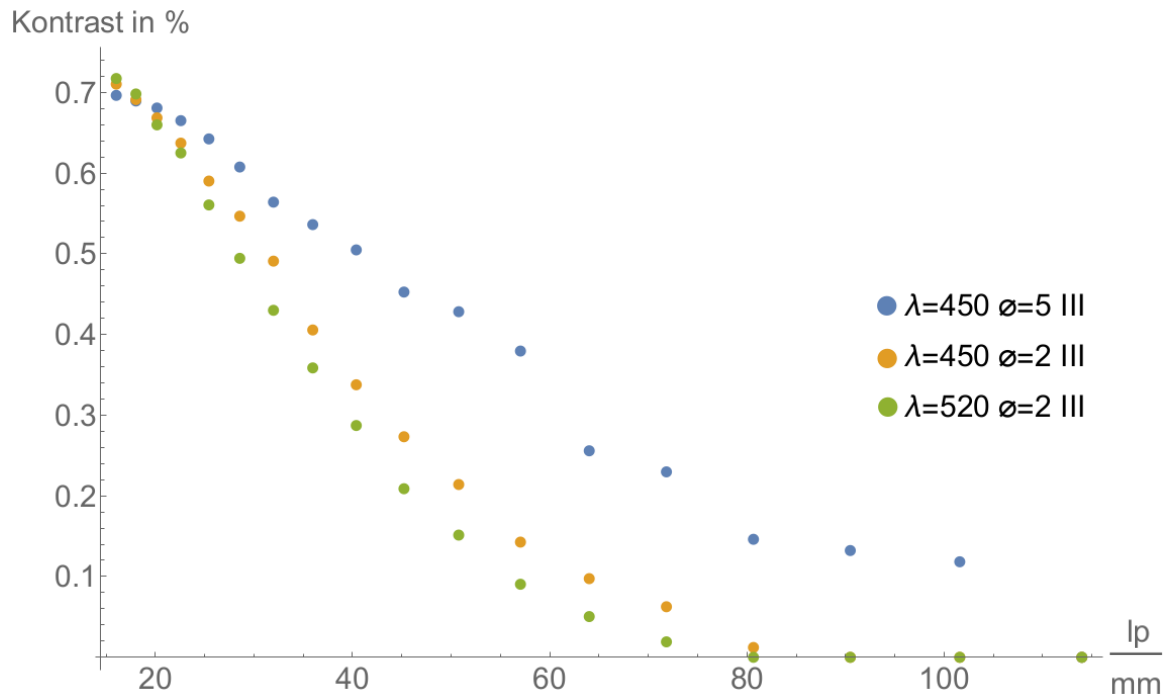


Abbildung 9: Kontrast bei hohen $\frac{lp}{mm}$ in horizontaler Scanrichtung.

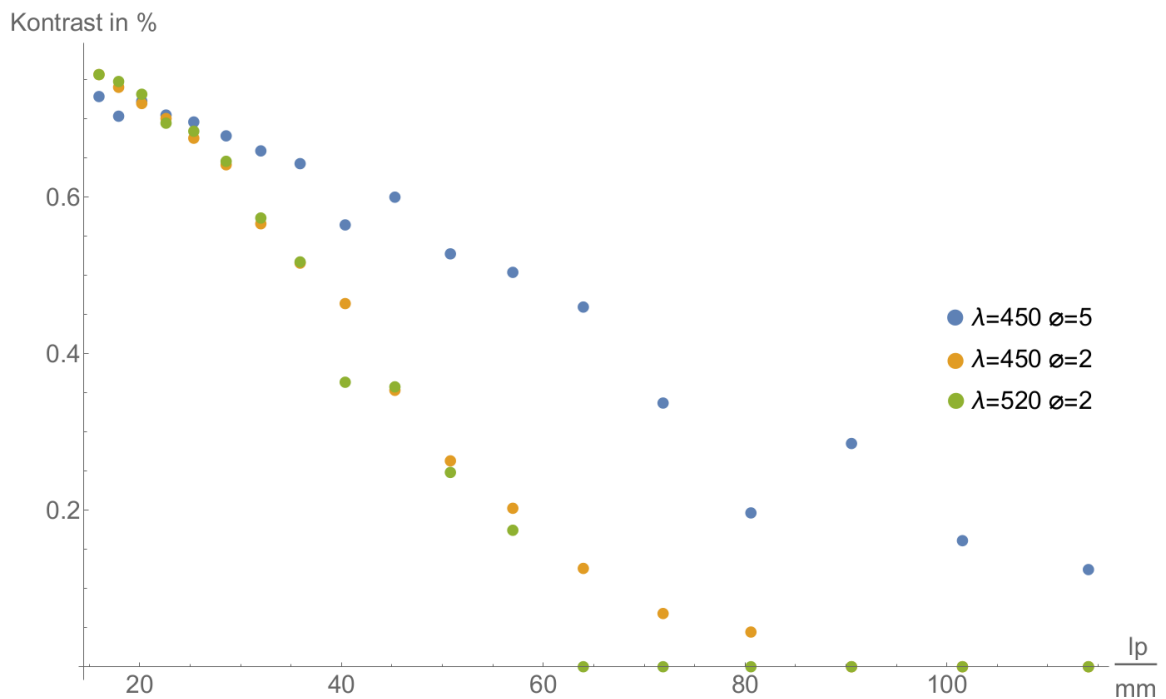


Abbildung 10: Kontrast bei hohen $\frac{lp}{mm}$ in vertikaler Scanrichtung.

Auch bei hohen $\frac{lp}{mm}$ verbessert ein erhöhter Strahlendurchmesser den Kontrast. Zwar ist der Kontrast bei einer geringen (lp/mm) bei einer höheren Wellenlänge höher, aber ab etwa $20\frac{lp}{mm}$ erhöht eine kleine Wellenlänge den Kontrast.

Weiterhin sind die Modulationsübertragungsfunktionen für hohe $\frac{lp}{mm}$ in Abbildung 11 dargestellt, um diese untereinander besser vergleichen zu können.

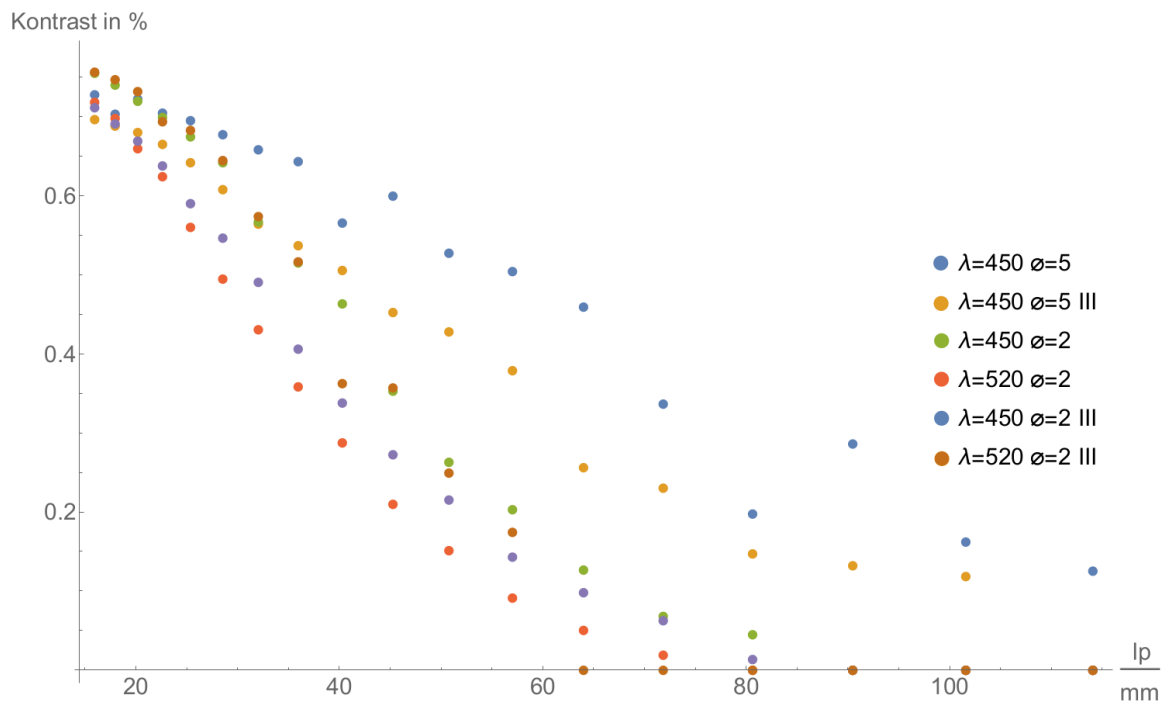


Abbildung 11: Kontrast bei hohen $\frac{lp}{mm}$ in vertikaler und horizontaler Scanrichtung für einen besseren Vergleich untereinander.

3.2 Aufnahmen von Heuschreckengehirnen

In diesem Versuchsabschnitt wurde als Probe ein präpariertes Heuschreckengehirn gewählt. Die Probe wurde in einer Küvette von oben in Glycerin getaucht und wurde um die z -Achse gedreht. Mit einer 360° -Drehung um die z -Achse wurden die Aufnahmen unter verschiedenen Winkeln aufgenommen. Interessant war bei dieser Messung, dass die Fluoreszenz mit dem Photomultiplier (PMT) dargestellt werden konnte, da es sich hier, im Gegensatz zum USAF-Target, um eine dreidimensionale Probe handelt, die fluoresziert.

3.2.1 Korrektur der Schiefelage

Die durchschnittliche Schiefelage der Probe α konnte bei der Auswertung ausgeglichen werden. Dazu wurde der Drehachsendurchlauf am oberen und unteren Bildrand gemessen und der Winkel α nach folgender Formel berechnet:

$$\alpha = \arcsin \left(\frac{\Delta x_{\text{oben}} - \Delta x_{\text{unten}}}{y_{\text{max}}} \right).$$

Hier entspricht y_{max} der Anzahl der Pixel auf der y -Achse im Bild. Δx_{oben} und Δx_{unten} beziehen sich hierbei auf die äußersten Pixel am Bildrand oben und unten.

Um Δx_{oben} und Δx_{unten} zu messen wurde die jeweilige Ebene mit 100 verschiedenen x -Achsenverschiebungen mit „tilt“ rekonstruiert und anschließend das beste Bild herausgesucht (Reduzierung der Ringartefakte).

Im Folgenden wurde die Aufnahme mit „ImageJ“ um den jeweiligen Winkel gedreht und das Ergebnis wieder mit „tilt“, aber dieses Mal für alle Ebenen rekonstruiert. Dabei wurde auch die mittlere x -Achsenverschiebung beachtet:

$$\Delta x = \frac{\Delta x_{\text{oben}} - \Delta x_{\text{unten}}}{2}.$$

3.2.2 Darstellung der Rekonstruktion

Eine Verlängerung der Integrationszeit Δt von 1 zu 2 Sekunden hatte nur eine Aufhellung des PMT-Bildes zur Folge. Da bei dieser Aufnahme jedoch ein unpassender Filter verwendet wurde, zeigt das PMT-Bild auch nur das gestreute Licht. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 zu sehen.

Mit der Photodiode lassen sich die äußeren Umrisse gut erkennen, mit dem Photomultiplier sogar die Dichte im Inneren.

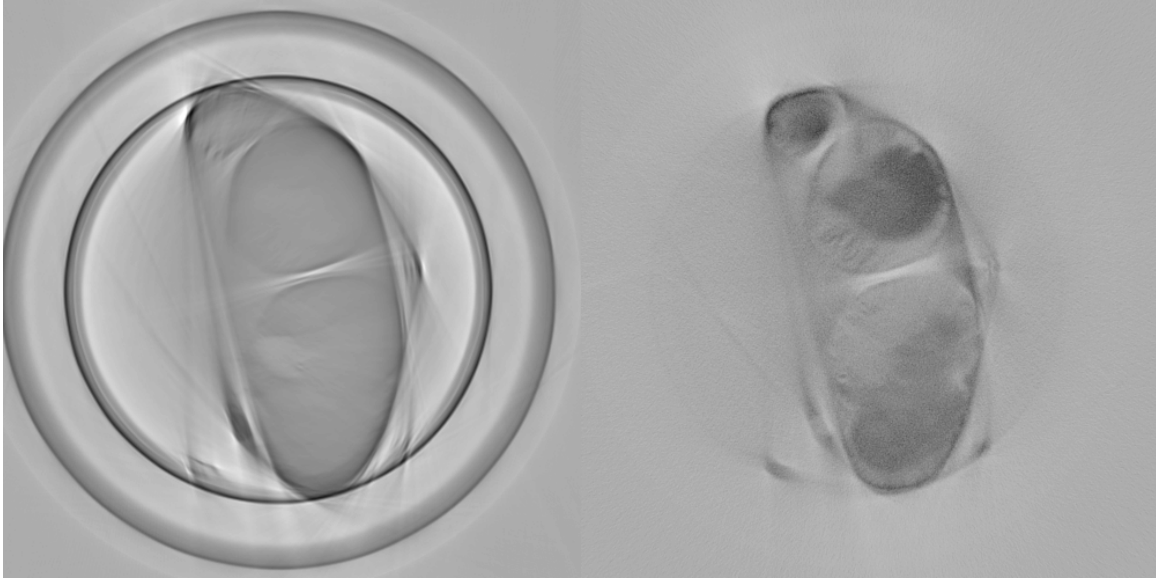


Abbildung 12: Rekonstruktion: Photodiode links, PMT rechts; $\lambda = 450$ nm, $\Delta t = 2$ s, $\lambda_{\text{Filter}} = (520 \pm 36)$ nm, $d_{\text{Strahl}} = 5$ mm, Kontrast angepasst

In Abbildung 13 sind 2 Rekonstruktionen der Bilder der Photodiode dargestellt. Es ist erkennbar, dass das Bild mit der längeren Wellenlänge feinere Strukturen im Heuschreckengehirn auflöst.

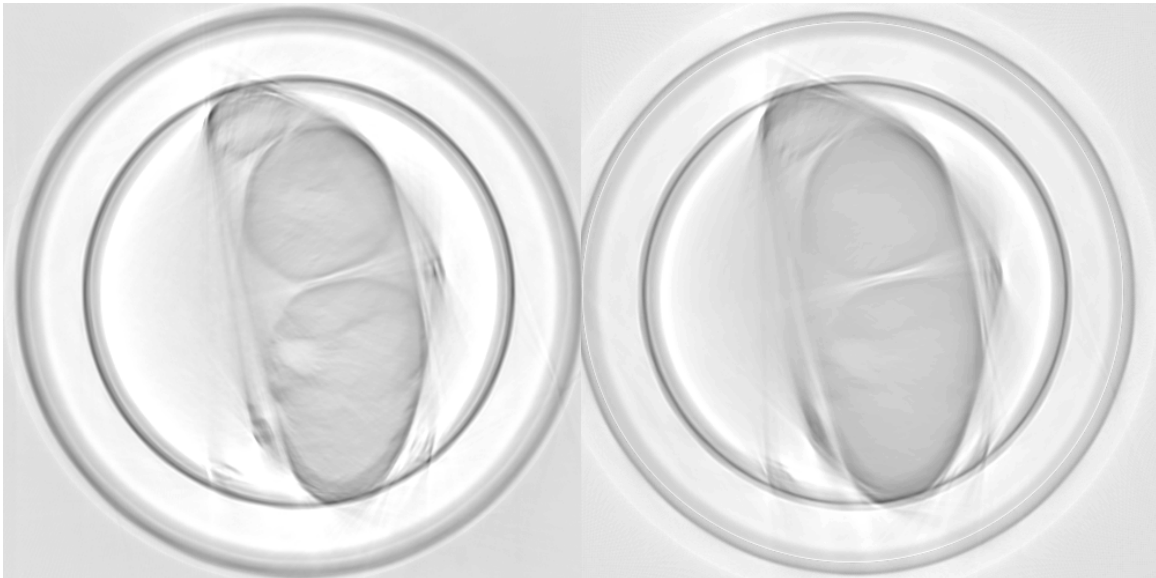


Abbildung 13: Rekonstruktion: $\lambda = 520$ nm links, $\lambda = 450$ nm rechts; Photodiode, $\Delta t = 1$ s, $\lambda_{\text{Filter}} = (520 \pm 36)$ nm, $d_{\text{Strahl}} = 5$ mm, Kontrast angepasst

In Abbildung 14 wurden Bilder des PMT vom jeweiligen Fluoreszenzlicht der Laser rekonstruiert. Im Vergleich ist festzustellen, dass bei $\lambda = 520$ nm die $\frac{lp}{mm}$ höher ist.

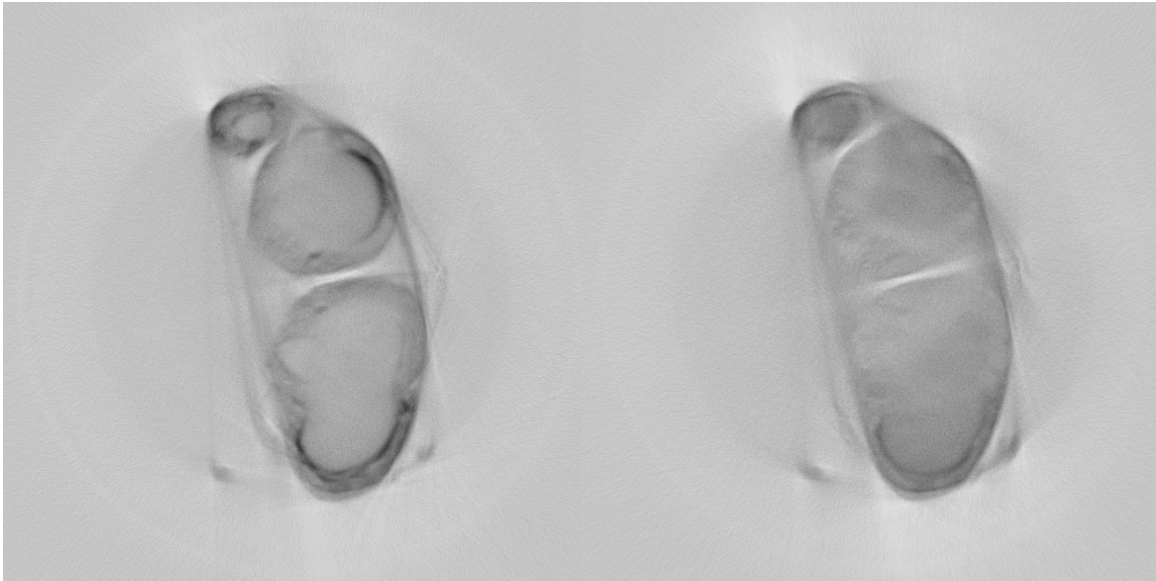


Abbildung 14: Rekonstruktion: $\lambda = 520$ nm mit $\lambda_{\text{Filter}} = (676 \pm 29)$ nm links,
 $\lambda = 450$ nm mit $\lambda_{\text{Filter}} \geq 570$ nm rechts; PMT, $\Delta t = 1$ s,
 $d_{\text{Strahl}} = 5$ mm, Kontrast angepasst

Mit dem ImageJ-Plugin „Volume Viewer“ , ist es nach der Rekonstruktion möglich verschiedene Ansichten auf das Heuschreckengehirn zu generieren. Ein mögliche Ansicht ist in Abbildung 15 dargestellt.

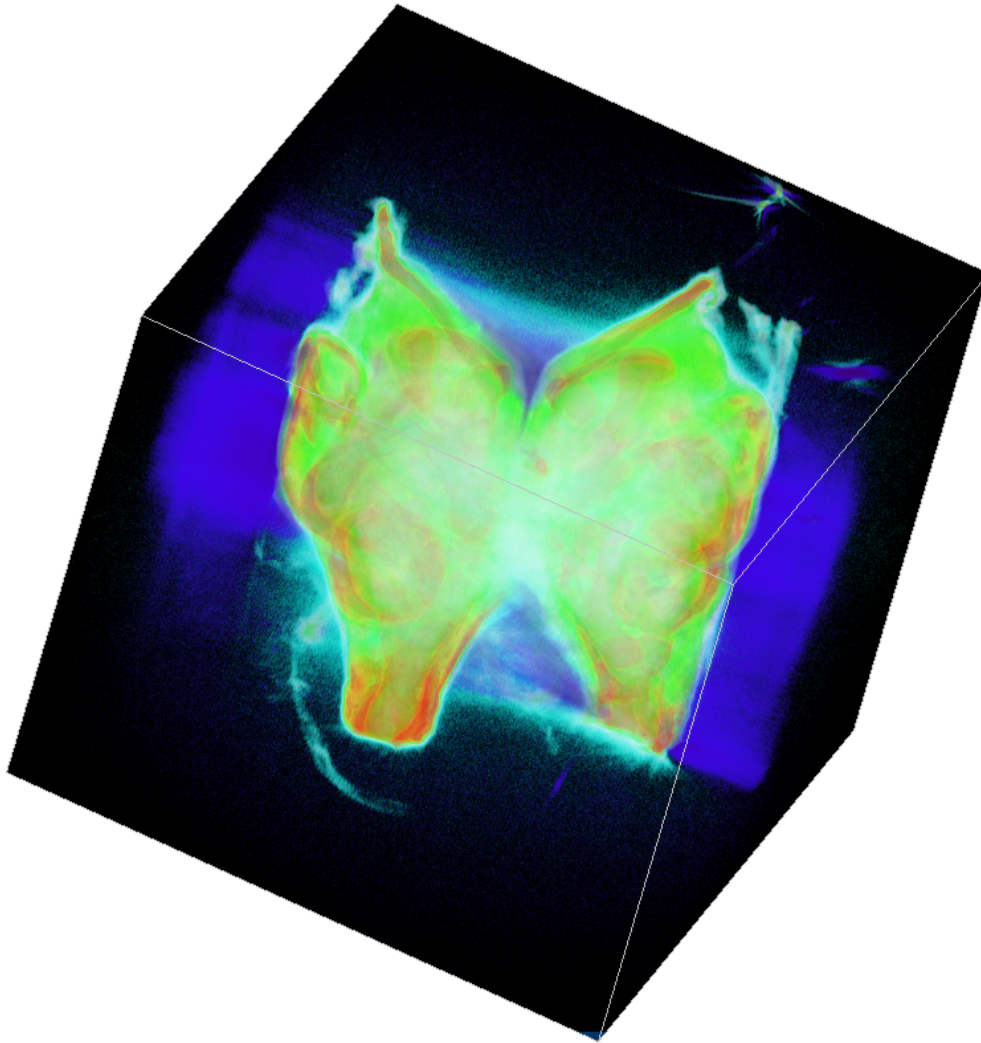


Abbildung 15: 3-dimensionale Ansicht einer PMT-Aufnahme: $\lambda = 520$ nm mit
 $\lambda_{\text{Filter}} = (676 \pm 29)$ nm, $\Delta t = 1$ s, $d_{\text{Strahl}} = 5$ mm

3.2.3 Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung

Zum Einen haben wir zum Einfädeln der Laser in eine Glasfaser das Verfahren Beamwalk benutzt. Da dies aber sehr lange gedauert hat haben wir es darum ergänzt, dass man beim korrigieren der Spiegel immer ein bisschen weiter dreht als das Maximum der Intensität. Das haben wir gemacht, da der normale Beamwalk das absolute Maximum nur nach unendlich vielen Schritten erreicht. Wenn man aber die Schritte über das Maximum hinaus macht, dann kommt man schneller zum Maximum, kann es jedoch je nach Schrittgröße nicht erreichen, da man es überspringt. Ab diesem Punkt führt man wieder den normalen Beamwalk durch.

Man kann unser Verfahren vergleichen mit einer alternierenden Reihe, die schneller konvergiert, als wenn man den Betrag der Reihenglieder betrachten würde.

Eine weitere Schwierigkeit ist bei den Messungen mit sich drehender Probe aufgetreten. Man musste die Drehachse genau senkrecht positionieren, damit sie nicht präzessiert. Dies konnten wir durch unsere Justage und die limitierte Genauigkeit der direkten Bildanzeige nicht ganz verhindern. In der Auswertung konnten wir dann leider auch nur die mittlere Schiefelage korrigieren.

In der Theorie sollte jedoch auch eine Korrektur der Präzession nach der Aufnahme noch möglich sein. Dazu müsste man jedes Bild einer 360°-Aufnahme um den richtigen Betrag drehen, den man mit einem Sinus berechnen könnte, wenn man die maximale Abweichung während der Präzession kennt.

In unserem Fall wanderte die Achse circa 4 Pixel in horizontaler Richtung, was für unser Ergebnis noch in Ordnung war.

3.2.4 Analyse

Wie erwartet lassen sich in den Aufnahmen mit dem PMT die inneren Strukturen besser erkennen, da hier die Fluoreszenz aufgenommen wurde. In Abbildung 14 kann man außerdem sehen, dass verschiedene Wellenlängen unterschiedliche Bereiche verschieden stark zum Fluoreszieren bringen.

Das unser Meinung nach beste Ergebnis konnten wir beim PMT mit der Kombination des 520 nm-Lasers und dem (676 ± 29) nm-Filter erzeugen. Deshalb ist dies nochmal mit einer 3-dimensionalen Ansicht des gesamten Heuschreckengehirns abgebildet.

Wir hatten kein Problem mit zu starker Absorption, wie sie nach Lorbeer [2] bei einer zu großen Probe auftritt.

Insgesamt sind wir mit den Ergebnissen unserer Messung zufrieden.

4 Diskussion

Text!

5 Fazit

Text!

6 Ausblick

Text!

Abbildungsverzeichnis

1	Graphische Darstellung der Radontransformation: Parametrisierung eines Strahls $lin_{\rho,\phi}(s)$ in Polarkoordinaten, wobei s dem Radius und ϕ der Polarwinkel ist. Die Schar an Strahlen wird durch ρ parametrisiert. Das Präparat wird durch die rote Fläche $f(x, y)$ dargestellt und hinter dem Präparat ist das integrierte Signal über die verschiedenen Strahlen der Schar dargestellt, die zusammengenommen die Radontransformierte $R(\rho, \phi)$ ergeben [2].	3
2	Schema eines scannenden laseroptischen Tomographen (SLOT) [2]. Der schematische Kollimator ist im Versuchsaufbau ein Bündel von Glasfasern, das an die Unterseite der Küvette angebracht ist und mit der Form eine ähnliche Fläche ausfüllt wie die Photomultiplier-Diode (PMT), sodass möglichst viel der Diode ausgeleuchtet werden kann. Der Nutzen des Kollimator ist das gesammelte Licht senkrecht auf die dielektrischen Farbfilter zu leiten, denn nur dann sind die angegebenen Werte des Herstellers bezüglich der Transmission bestimmter Wellenlängen verlässlich. Ansonsten treten Abweichung der Reflexion und Transmission in Abhängigkeit vom Einfallswinkel entsprechend den Fresnelschen Formeln auf.	4
3	Versuchsaufbau: Der gesamte Versuchsaufbau befindet sich auf einer optischen Platte, um Störungen durch Vibration zu verringern. Weiterhin ist die Kompaktheit des Versuchsaufbaus zu sehen [1].	5
4	Das Teleskop ist für die Fokussierung und ermöglicht eine gewisse Flexibilität bei der Einstellung des Strahlendurchmessers des scannenden Lichtstrahls. Weiterhin sind x- und y-Scanner, die das Abrastern des Präparats ermöglichen, zusehen. [1]. Das Steinheil-Triplett ist eine aus drei Linsen zusammengesetzte Linse, die die nötigen Freiheitsgrade liefert um Seidel Aberration auszugleichen.	6
5	Trennung der Laserkonfiguration vom restlichen Versuchsaufbau zur Verringerung der Wahrscheinlichkeit die Ergebnisse der Einkopplung des Diodenlichtes beim Experimentieren zu nichte zu machen. [1]. Weiterhin werden Dichromaten genutzt, um durch die selben Reflexionsobjekte verschiedene Wellenlängen einkoppeln zu können und das Experimentieren mit unterschiedlichen Wellenlängen durch An- und Ausschalten der entsprechenden Laserdioden problemlos gelingt. . . .	7
6	Zusehen ist der Turm mit der Rotationsachse, die beim Versuch dann mittels Kapillarhalterung das in einer Kapillare fixierte Präparat rotiert. In der Probenkammer wird dann eine Küvette mit Glycerin aus oben genannten Gründen stehen, in die die Kapillare eingetaucht ist. [1].	8

7	Kontrast bei geringen $\frac{lp}{mm}$ in horizontaler Scanrichtung, wobei in der Legende „III“ die Ausrichtung der Dunkellinien des USAF-Targets sind, woraus die Scanrichtung sich als horizontal erschließt.	9
8	Kontrast bei geringen $\frac{lp}{mm}$ in vertikaler Scanrichtung.	10
9	Kontrast bei hohen $\frac{lp}{mm}$ in horizontaler Scanrichtung.	11
10	Kontrast bei hohen $\frac{lp}{mm}$ in vertikaler Scanrichtung.	11
11	Kontrast bei hohen $\frac{lp}{mm}$ in vertikaler und horizontaler Scanrichtung für einen besseren Vergleich untereinander.	12
12	Rekonstruktion: Photodiode links, PMT rechts; $\lambda = 450$ nm, $\Delta t = 2$ s, $\lambda_{\text{Filter}} = (520 \pm 36)$ nm, $d_{\text{Strahl}} = 5$ mm, Kontrast angepasst	14
13	Rekonstruktion: $\lambda = 520$ nm links, $\lambda = 450$ nm rechts; Photodiode, $\Delta t = 1$ s, $\lambda_{\text{Filter}} = (520 \pm 36)$ nm, $d_{\text{Strahl}} = 5$ mm, Kontrast angepasst	14
14	Rekonstruktion: $\lambda = 520$ nm mit $\lambda_{\text{Filter}} = (676 \pm 29)$ nm links, $\lambda = 450$ nm mit $\lambda_{\text{Filter}} \geq 570$ nm rechts; PMT, $\Delta t = 1$ s, $d_{\text{Strahl}} = 5$ mm, Kontrast angepasst	15
15	3-dimensionale Ansicht einer PMT-Aufnahme: $\lambda = 520$ nm mit $\lambda_{\text{Filter}} = (676 \pm 29)$ nm, $\Delta t = 1$ s, $d_{\text{Strahl}} = 5$ mm	16

Literatur

- [1] LENA NOLTE, *Versuchsanleitung: IQ18 SLOT für das Laborpraktikum Atom- und Molekülphysik der Leibniz Universität Hannover* (2015)
- [2] RAOUL-AMADEUS LORBEER, *Dreidimensionale und effiziente Erfassung mesoskopischer Proben* (2013)